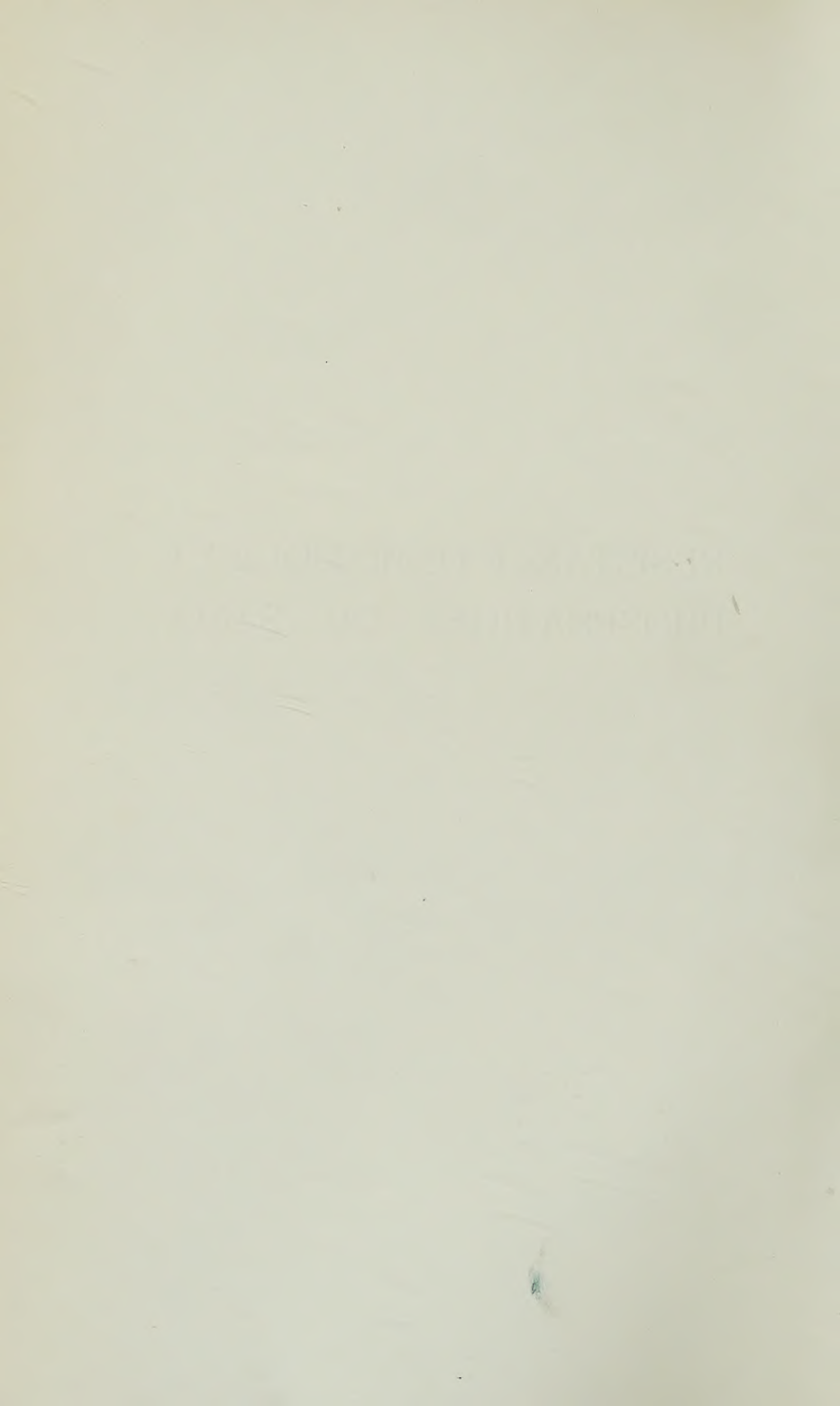


Lane Medical Library

RÉSISTANCE OSMOTIQUE ET
PHOSPHATIDES DU SANG.

R. BRINKMAN

RÉSISTANCE OSMOTIQUE ET PHOSPHATIDES DU SANG.



RÉSISTANCE OSMOTIQUE ET PHOSPHATIDES DU SANG.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN
GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
DR. F. M. JAEGER, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
TEGEN DE BEDENKINGEN DER FACULTEIT IN
HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP DONDER-
DAG 6 JULI 1922, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR

DOOR

ROBERT BRINKMAN, Arts,

GEBOREN TE COEVORDEN.

AAN MIJNE MOEDER.

AAN MIJNE VROUW.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Bij het voltooien van dit proefschrift maak ik gaarne van de gelegenheid gebruik, U, Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren en Oud-Lector der Geneeskundige en Natuurphilosophische Faculteiten te Groningen, te danken voor het van U genoten onderwijs.

Aan U, Hooggeleerde HAMBURGER, Hooggeachte Promotor moet ik in het bijzonder mijn groote erkentelijkheid en diepgevoelden dank uitdrukken, voor de steeds welwillende en belangstellende leiding, welke ik van U als Uw assistent en tijdens het bewerken van dit proefschrift mocht ondervinden.

Ten slotte een woord van hartelijken dank aan allen, wetenschappelijk en technisch personeel van het physiologisch laboratorium, welke mij bij het uitvoeren van mijn onderzoek behulpzaam waren.

RÉSISTANCE OSMOTIQUE ET PHOSPHATIDES DU SANG.
NOUVELLES MÉTHODES QUANTITATIVES

PAR

R. BRINKMAN.

(LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ DE GRONINGUE).

INTRODUCTION.

L'étude de la résistance des globules sanguins rouges est un problème de biochimie générale. Si nous voulons essayer d'analyser de plus près la détermination de la résistance globulaire, nous devons nous laisser guider par les considérations d'ionique chimique et de chimie colloïdale, qui sont les directrices des études de perméabilité modernes; les résultats généraux de l'examen de la perméabilité de membranes et des propriétés de la surface cellulaire sont pour nous d'importance fondamentale.

Nous devons, en tout premier lieu, poser la question si l'on peut bien admettre l'existence d'une membrane cellulaire et en particulier d'une membrane autour du globule sanguin rouge. D'un point de vue fonctionnel il y a beaucoup à dire en faveur d'une membrane cellulaire spéciale. Nous savons que le protoplasme peut être considéré le mieux comme un liquide et que des sels et d'autres cristalloïdes y sont dissous librement, dans état non-combiné. Il doit donc y avoir quelque chose qui règle la diffusion de ces substances vers l'intérieur et vers l'extérieur de la cellule et les dernières recherches dans cette direction ont établi la probabilité que ce régulateur est une couche cellulaire superficielle, fonctionnant comme „membrane”.

(Nous ne devons toutefois pas passer sous silence que certains auteurs (M. FISCHER, ROAF) considèrent l'hypothèse de l'existence d'une membrane comme superflue et pensent pouvoir ramener tous les phénomènes de perméabilité à une absorption colloïdale et un gonflement; mais, selon BAYLISS, ces conclusions ne sont pas motivées).¹⁾

¹⁾ BAYLISS, Principles Gen. Physiol., p. 119.

ALBRECHT¹⁾ a fourni des preuves de l'existence d'une membrane autour des globules sanguins rouges par voie purement anatomique; d'après lui un composé de la lécithine en serait le principal constituant.

On a beaucoup écrit au sujet de la composition chimique de cette membrane; nous devons nous borner à examiner les faits les plus importants pour nous. La surface du globule sanguin est une limite de phase, de sorte que les substances du contenu de ces globules et du plasma sanguin qui peuvent abaisser l'énergie superficielle doivent se concentrer dans cette limite. Ces substances doivent donc être une partie constituante de la surface, et il est plus que probable que cette condensation superficielle est l'origine de la membrane cellulaire.

La membrane cellulaire doit donc être considérée comme une concentration locale de substances du protoplasma cellulaire et du milieu environnant. Cette manière de voir est illustrée d'une manière frappante par les préparations de cellules de CHAMBERS²⁾, qui montrent que la couche protoplasmique superficielle a les propriétés d'un gel. L'examen ultramicroscopique direct des globules sanguins rouges confirme l'existence de cette membrane (BECHHOLD, DIETRICH).

Les premières substances qui entrent en ligne de compte pour la formation d'une parcellle membrane sont les phosphatides et la cholestérine, ensuite beaucoup de globulines. Ces substances sont toujours présentes dans le protoplasme et abaissent considérablement la tension superficielle, sauf la cholestérine; elles doivent donc être concentrées à la limite de la phase.

OVERTON, en se basant sur ses nombreuses études de perméabilité, aboutit également à la conclusion que la limite de la cellule doit avoir une nature essentiellement „lipoïde” et que la perméabilité dépend du coefficient de partage d'une substance entre le „lipoïde” et l'eau.

Mais de nouvelles recherches ont appris que, dans leur forme primitive, les conclusions d'OVERTON sont certainement inexactes. Le principe de partage a été remplacé par la théorie d'absorption (LOEWE)³⁾, mais celle-ci ne peut pas non plus donner une explication des phénomènes de perméabilité.⁴⁾ Il semble nécessaire d'admettre que la membrane n'est

¹⁾ ALBRECHT, *Ber. Münch. morph. phys. Ges.*, **19**, n°. 2, p. 16. Voir aussi DIETRICH, *Münch. Med. Woch.*, 1921, p. 1071.

²⁾ CHAMBERS, *Amer. Journ. Physiol.*, **43**, 1.

³⁾ LOEWE, *Biochem. Zeitschr.*, **42**, 150 et 213.

⁴⁾ Voir aussi CZAPEK, qui rendit probable que les cellules végétales aussi ont

pas seulement constituée de lipoides; une structure en mosaïque de lipoides et de matières albuminoïdes est également peu probable; ce qui semble le plus rationnel, c'est d'admettre une structure colloïdale complexe de „lipoides” et de matières albuminoïdes. Mais que les lipoides sont en tous cas un constituant très important de la membrane, cela est hors de doute et l'étude des propriétés colloïdo-chimiques de la lécithine et de la cholestérine doit être la base de l'examen de la membrane cellulaire.

L'hypothèse que la membrane cellulaire est une concentration locale de substances du contenu de la cellule et du milieu environnant implique la variabilité de cette membrane, laquelle est absolument nécessaire pour la perméabilité physiologique. La structure colloïdale de cette membrane nous apprend aussi que ses propriétés ne sauraient être constantes; surtout les électrolytes du contenu cellulaire et du milieu doivent avoir une grande influence sur la structure colloïdo-chimique de la membrane et notamment chaque ion doit agir d'une manière spécifique.¹⁾

Aussi devons-nous, pour analyser la détermination de la résistance, partir des points vue généraux suivants:

1. *Le globule rouge contient des électrolytes et d'autres substances dissoutes qui peuvent exercer une pression osmotique considérable.*

2. *Il est enveloppé d'une membrane plus ou moins semiperméable.*

3. *Cette membrane est une concentration locale de substances qui proviennent du contenu cellulaire et du milieu ambiant et qui abaissent la tension superficielle de contact des globules et du liquide de suspension, et elle contient comme telle une grande quantité de ce qu'on appelle des „lipoides”.*

4. *La membrane varie donc suivant le contenu cellulaire et le milieu et est influencée spécifiquement par les électrolytes dissous environnants.*

L'état dans lequel se présente l'oxyhémoglobine dans la cellule et la localisation de cette substance constituent des problèmes au sujet desquels les opinions sont encore partagées. A mon avis la meilleure représentation est celle de STEWART²⁾, dans laquelle on admet que l'hémoglobine se trouve à l'état de combinaison colloïdale complexe (hémochrome). L'intégrité de ce complexe dépend de l'équilibre physico-chimique

une membrane formée de „lipo-colloïdes” (*Int. Zeitschr. f. physik-chem. Biol.*, **1**, 108, 1914).

¹⁾ Voir HAMBURGER, A Discourse on Permeability in Physiology and Pathology. *Lancet*, 1921, II, p. 1039.

²⁾ STEWART, *Journ. Pharmacol. and exp. Ther.*, **1**, 49 et 121.

d'électrolytes et de colloïdes dans le globule sanguin; cet équilibre est-il troublé, p. ex. par la pénétration d'eau par suite d'une différence de pression osmotique, il se produit une hémochromolyse (intracellulaire); l'hémoglobine libre quitte très rapidement la cellule. Le colloïdo-chimisme de ces processus a été étudié dans ces derniers temps de façons très diverses (v. KNAFFL-LENZ, HAFNER, JOBLBAUER, STRAUB et MEYER, TRARBE) sans que notre intelligence du processus biologique de l'hémolyse en soit devenue beaucoup plus nette. La grande activité superficielle de l'hémoglobine fait présumer qu'elle doit être concentrée aux surfaces; cette surface n'est pas nécessairement la seule surface externe, visible, des érythrocytes; elle est probablement beaucoup plus grande, par suite d'une structure réticulaire du stroma.

Les recherches ultramicroscopiques de BECHHOLD ¹⁾ sont directement localisantes; cet auteur voit l'érythrocyte comme une gouttelette de solution d'hémoglobine et de sel, enveloppée d'un fin réseau fibrillaire (toile d'araignée) de matières albuminoïdes gonflées; les mailles de ce réseau sont remplies d'un mélange colloïdal homogène de cholestérine et de lécithine. On a donc dans la membrane cellulaire une combinaison par adsorption de 3 groupes de substances colloïdales, savoir de l'albumine gonflée, de la lécithine gonflée et de la cholestérine. Les influences qui produisent une „démixtion” d'une ou plusieurs de ces substances donnent lieu à une hémolyse, due à ce que la membrane des globules sanguins devient perméable. Il y a certainement beaucoup de choses attrayantes dans cette manière de voir, à laquelle on est arrivé à l'aide de l'ultramicroscope et en se basant sur des études de chimie colloïdale pure; mais la théorie n'est pas complète, car on n'y tient pas compte de l'adsorption de l'hémoglobine elle-même. Comme base d'une étude de l'hémolyse intravitale elle est une confirmation instructive de beaucoup de faits déjà connus.

I.

CRITIQUE DES MÉTHODES ACTUELLES DE DÉTERMINATION DE LA RÉSISTANCE DES GLOBULES.

Les méthodes de détermination de résistance les plus importantes et les plus usitées reposent toutes sur le principe, établi par HAMBURGER,

¹⁾ BECHHOLD, *Munch. Med. Woch.*, 68, 127, 1921.

que les globules sanguins hémolysent dès que la différence de pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule atteint une certaine valeur. Nous nous bornerons essentiellement aux méthodes qui se basent sur ce principe.

HAMBURGER ¹⁾ lui-même a donné dans le temps une analyse du problème de la résistance et proposé une nouvelle méthode. Il a fait comprendre la nature complexe des déterminations de résistance et indiqué le rôle joué par les volumes relatifs du stroma et de l'hémoglobine.

Mais avant tout HAMBURGER a insisté sur ce fait que précisément en raison de notre ignorance complète du problème examiné il est nécessaire d'introduire de l'unité dans la méthode. Car sans concordance dans les méthodes il est très difficile de comparer les résultats des divers chercheurs.

Il est bien regrettable que ce conseil de HAMBURGER n'a pas été suivi; si on l'avait fait les nombreuses recherches de ces dernières années n'auraient pas conduit à des conclusions aussi divergentes, et elles seraient mieux comparables entre elles.

On trouve un aperçu des méthodes les plus nouvelles dans la thèse de doctorat de SOMMER ²⁾. Comme principales différences dans les façons d'opérer des divers auteurs il donne:

- a. La façon dont le sang est recueilli;
- b. La défibrination—ou non—du sang;
- c. Le lavage—ou non—du sang;
- d. Le rapport entre la quantité de sang et la quantité de solution hypotonique
- e. La durée de l'action;
- f. La température pendant l'action;
- g. La centrifugation—ou non—du sang.
- e. La façon de faire les lectures (par numération ou par colorimétrie).

(On voit déjà par là combien il y a peu d'unité dans les méthodes. La base de la méthode, l'hémolyse en solution pure hypotonique de *NaCl*, est commune à toutes les recherches récentes et c'est précisément cette base que nous voulons soumettre à une analyse précise. Nous devons partir pour cela des dernières recherches physico-chimiques dans cette direction.

Nous savons, depuis les recherches fondamentales de SYDNEY RINGER (1880—

¹⁾ Osmot. Druck u. Ionenlehre, I, 359—394.

²⁾ SOMMER. Thèse de doctorat, Groningue, 1917.

1883)¹⁾, qu'une solution de $NaCl$ pure, employée comme liquide de perfusion ou milieu de suspension pour des organismes animaux, ne convient pas du tout à ce but. Les expériences classiques de RINGER peuvent encore toujours servir de modèle pour des recherches analogues; c'est pourquoi je donne ici un aperçu sommaire de ses travaux sur la perfusion du cœur de grenouille.

Lorsqu'il faisait circuler dans cet organe une solution pure de $NaCl$ à 0,75 %, les contractions automatiques cessaient presque complètement au bout de 10 minutes et l'excitabilité électrique aussi avait disparu presque complètement. Alors l'addition d'une petite quantité de $CaCl_2$ au liquide de perfusion avait pour conséquence le retour de l'excitabilité électrique, et les contractions automatiques aussi se montraient de nouveau nettement. Cependant le cœur restait contracté en systole et RINGER reconnut plus tard qu'il fallait encore ajouter 0,01 % de KCl pour faire disparaître ce tonus pathologique. Bien qu'à cette époque la théorie de la dissociation électrolytique ne fût pas encore établie, RINGER comprenait déjà que ce qui importait dans ces expériences c'était le constituant métallique des sels et non le reste acide. En outre, RINGER ajoutait déjà un peu de $NaHCO_3$ à son liquide pour lui donner une réaction légèrement alcaline. Ce n'est que plus tard qu'on a reconnu la grande signification de la concentration des ions H dans les liquides physiologiques.

On voit déjà par ces expériences que la présence de combinaisons d'ions dans les liquides physiologiques est nécessaire pour que les tissus gardent leur fonction normale. Ce principe de RINGER a toujours été trouvé confirmé dans la suite et la connaissance des actions de combinaison et antagonistes des ions a été considérablement développée.

Il n'est pas nécessaire, pour notre but, de donner un aperçu de la littérature étendue, d'autant plus qu'il existe déjà de nombreuses monographies sur ce sujet²⁾. Nous n'insisterons que sur quelques points importants pour nous.

Nous devons, en premier lieu, examiner la méthode que l'on a suivie dans l'étude des combinaisons et des antagonismes d'ions. On peut, d'une façon générale, distinguer deux groupes de méthodes, les méthodes dynamiques fonctionnelles et les méthodes analytiques.

Les méthodes fonctionnelles ont été employées dans la grande majorité des cas. L'exemple classique en sont les expériences de RINGER que je viens de décrire: elles examinent l'influence des ions et des combinaisons d'ions sur les organes, les tissus et les cellules. Les lois du système d'ions combinés ont été étudiées sur un grand nombre d'organes „en survie", ou sur des tissus plus ou moins isolés ou encore sur des organismes inférieurs en suspension et des cellules végétales; et à l'aide des résultats obtenus on a donné des liquides de perfusion

¹⁾ *Journ. of Physiol.*, 3, 380, 4, 29.

²⁾ FEENSTRA, Thèse de doctorat, Utrecht, 1921.

qui ont la propriété de faire conserver aussi bien que possible sa fonction à un organe déterminé en survie ou à un organisme. Ces liquides diffèrent assez bien les uns des autres, tant au point qualitatif qu'au point de vue quantitatif, ainsi que le prouve le tableau suivant.¹⁾

	RINGER- LOUKE	TYRODE	GÖTTLIN	SAKAI	HEDON	ADLER	GERLACH
H_2O	1000	1000	1000	1000	1000	967,92	1000
$NaCl$	9,5	8	6,5 (sang froid)	6	6 (sang froid)	5,9 (sang froid)	9
KCl	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,4	—
$CuCl_2$	0,2	0,2	0,065	0,1	0,1	0,4	1
$MgCl_2$	—	0,1	—	—	—	0,25	—
$MgSO_4$	—	—	—	—	0,3	—	—
$NaHCO_3$	0,1	1	1	1	1,5	3,51	—
Na_2HPO_4	—	—	0,009	—	0,5	—	—
NaH_2PO_4	—	0,05	0,008	—	—	0,126	—

Cette méthode fonctionnelle n'est pas idéale, bien qu'elle ait appris beaucoup de faits importants. Si l'on songe à la grande différence qu'il y a entre en organe „en survie”, perfusé au moyen d'une solution saline, le plus souvent exempte de colloïdes, et un tissu fonctionnant dans un milieu naturel, on comprend que les rapports d'ions trouvés de cette manière ne sont pas nécessairement encore les rapports physiologiques réels. En outre, on comprend immédiatement qu'un liquide qui convient le mieux pour un organe déterminé n'est pas pour cela le liquide le plus convenable pour tous. Si l'on compare p. ex. le liquide de GERLACH, qui a été trouvé pour le système nerveux central, à celui de TYRODE, qui a été composé pour l'intestin survivant, on constate que l'intestin a besoin de 7 espèces d'ions, alors que pour le système nerveux 3 espèces suffisent. Voilà pourquoi il est nécessaire que l'examen par la méthode fonctionnelle soit complété par une analyse directe du plasma sanguin au point de vue des ions.

La tentative la plus connue de composition d'une solution saline physiologique par voie analytique est celle de FRIEDENTHAL, qui constitua son „sérum inorganique”. FRIEDENTHAL analysa la teneur en ions de sérum de bœuf et prépara d'après ces recherches une solution saline

¹⁾ TSCHERMAK, Allg. Physiol., I, 1, p. 126.

contenant les mêmes ions dans les mêmes concentrations; la différence principale avec les solutions décrites ci-dessus est une teneur en $NaHCO_3$ de 0,4 % et une teneur en $NaCl$ de 0,6 % ¹⁾.

Mais la grande difficulté d'une pareille analyse est la détermination de la concentration réelle des ions dans le plasma sanguin.

Les résultats de la méthode bien connue de dialyse de compensation doivent être jugés avec grande prudence à ce point de vue, parce que les protéides d'ions sont très facilement décomposés dans cette méthode et en outre il n'est pas du tout certain que dans un équilibre d'ions obtenu de cette manière la concentration des ions est la même des deux côtés de la membrane. Cette dernière remarque s'applique également aux expériences d'ABEL sur la vividiffusion. En tous cas, ces méthodes sont déjà beaucoup plus précises que les méthodes antérieures de précipitation et d'incinération.

La méthode qui paraît la plus digne de confiance est l'analyse de l'ultra-filtrat du plasma sanguin, dans laquelle on doit veiller à ce que la tension de l'acide carbonique reste constante pendant le filtrage; dans ce procédé on tient également compte du volume relatif des colloïdes du plasma. HAMBURGER a commencé l'analyse systématique de l'ultra-filtrat comme base de la constitution d'une solution saline physiologique; mais les résultats ne sont pas encore de nature à être publiés.

Ainsi donc, bien que nous ne puissions pas encore dire que nous connaissons complètement, d'une façon quantitative, le système des concentrations des ions du plasma sanguin, il y a cependant quelques ions dont nous pouvons indiquer la concentration avec grande précision. Ces ions sont H^+ , Ca^{++} et HCO_3^- . Nous n'avons plus besoin de décrire les méthodes importantes et précises par lesquelles on détermine $[H^+]$; le $[HCO_3^-]$ s'obtient le mieux par la mesure de la tension de CO_2 et le $[Ca^{++}]$ peut être déduit par calcul de ces deux grandeurs ou être déterminé directement par une toute autre voie, à l'aide de la théorie des produits de solubilité ²⁾. Il est probable que cette dernière méthode est également applicable à la détermination des concentrations d'autres ions, mais c'est là une question qui doit encore être examinée.

Nous ne sommes donc pas encore en état d'indiquer avec précision

¹⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., 1903, p. 550.

²⁾ BRINKMAN et Mlle VAN DAM, *Proceedings Roy. Ac. Amsterdam*, 27, n° 7, 1919; ces *Archives* 4 590, 1920.

les rapports physiologiques réels des concentrations d'ions, mais nous pouvons bien dire avec certitude que toute solution saline physiologique doit contenir des combinaisons ou des systèmes antagonistes d'ions.

Un fait intéressant, c'est que le rapport de concentration des ions individuels dans les solutions salines physiologiques est analogue à celui dans l'eau de mer. C'est ainsi que le rapport $Na:K:Ca$ dans le liquide de RINGER pour les animaux à sang chaud est 100:1,7:1,1 et pour l'eau de mer 100:2,1:1. BUNGE pensait que la forte teneur en $NaCl$ du plasma des animaux terrestres est une preuve que leurs ancêtres ont vécu dans un milieu riche en chlorure de sodium. Si la concentration osmotique totale de l'eau de mer est cependant beaucoup plus élevée que celle du plasma sanguin, cela s'explique aisément par le fait que les rivières apportent continuellement des sels dans les mers qui s'évaporent.

Il est généralement admis que la vie sur terre commença dans la période cambrienne, de très longue durée; le sérum des animaux à sang chaud refléterait donc la teneur en sel de l'océan dans cette période. La forte teneur en Mg de l'eau de mer actuelle constitue cependant une difficulté dans cette manière de voir; mais MACALLUM a montré que cette teneur en Mg doit avoir été beaucoup plus faible dans la période cambrienne.

L'explication de la nécessité de la présence simultanée de plusieurs ions métalliques, trouvée aussi par voie fonctionnelle expérimentale que par voie analytique, est fournie par la chimie colloïdale. On peut dire en général que les actions antagonistes de divers ions ont leur origine dans l'influence opposée que ces ions exercent sur l'état physico-chimique des colloïdes du protoplasme. Et ce sont ici les colloïdes de la membrane cellulaire qui entrent en ligne de compte en premier lieu, lorsqu'il s'agit de l'action des ions du plasma.

Comme la membrane cellulaire est, ainsi que nous l'avons vu, une concentration locale des colloïdes hydrophiles du protoplasme, sa composition varie avec la constitution des cellules; elle peut donc être différente pour des tissus différents. C'est là peut-être la raison pour laquelle on a trouvé qu'il fallait des solutions salines différentes pour des organes différents.

L'action générale des ions sur les colloïdes hydrophiles consiste en ceci qu'ils influencent leur lyotropisme, c. à d. qu'ils régissent leur pouvoir de fixer l'eau. Sous l'influence des ions métalliques les colloïdes hydrophiles se rapprochent d'un côté des solutions pures, de l'autre des colloïdes en suspension, qui se composent en général de particules plus grandes et flocculent aisément. Or, les ions des alcalis ont une action lyotrope, qui fait que les colloïdes hydrophiles (p. ex. l'albumine et la

lécithine) absorbent de plus en plus d'eau et se liquéfient, tandis que les ions bivalents des alcalino-terreux ont une action inverse et empêchent les ions alcalins d'exercer leur action déliquescente. Tel est le principe fondamental de l'action dynamique des sels et la littérature récente contient une énorme quantité d'observations dans le domaine de la biologie et de la chimie colloïdale pure, où ce principe est illustré et confirmé ¹⁾.

Nous allons maintenant nous occuper uniquement du problème posé; c'est à dire que nous avons à examiner si, pour déterminer la résistance osmotique, il est permis d'observer l'hémolyse dans une solution de *NaCl* pure. Nous basant sur les derniers résultats décrits ci-dessus, nous pouvons bien dire que la membrane cellulaire est soumise à deux influences au moins, tout à fait différentes, savoir:

1°. La différence de pression osmotique;

2°. L'action lyotrope, liquéfiante, d'une solution pure de *NaCl*. La première influence est connue depuis les expériences classiques de HAM-BURGER; la seconde a été étudiée e. a. par HOEBER. Celui-ci trouve qu'en solution faiblement hypotonique de métaux alcalins purs les colloïdes de la membrane des érythrocytes, soumis à une action de longue durée, absorbent tant d'eau (tombent en déliquescence) qu'il se produit une hémolyse. Le fait que cette hémolyse se produit, pour les divers métaux alcalins, dans l'ordre de la série de HOFMEISTER bien connue, était pour lui la preuve qu'il avait réellement affaire ici à une action lyotrope sur les colloïdes hydrophiles de la membrane.

En n'y regardant pas de près on pourrait penser que l'influence lyotrope ne peut pas avoir beaucoup d'importance dans la détermination de la résistance osmotique, parce que l'hémolyse se produit en très peu de temps. Mais un examen plus attentif fait comprendre que l'effet lyotrope peut avoir de l'importance, au contraire, parce que le degré d'hydratation de la membrane cellulaire détermine la perméabilité, non seulement pour l'hémoglobine, mais aussi, et en premier lieu, pour l'eau et pour les cristalloïdes. Or, comme la différence de pression osmotique agit précisément en vertu de la différence de perméabilité à l'eau et aux sels, nous comprenons que l'action lyotrope des sels peut avoir une influence immédiate. Nous savons avec certitude que les changements

¹⁾ NEUSCHLOSS, *Pflüger's Archiv*, **181**, 17, 1920.

de perméabilité décrits se manifestent très rapidement. STRAUB p. ex. a montré qu'un pareil effet se produit dans le cœur de grenouille en moins de 0,1 sec. ¹⁾. Ces considérations nous forcent donc à tenir compte, ici aussi, de l'influence lyotrope.

MACALLUM ²⁾ a démontré en 1905 déjà que la perméabilité de globules sanguins est considérablement augmentée dans une solution de *NaCl* pure et qu'elle est diminuée de nouveau par une addition de *CaCl*₂.

Nous avons donc à examiner en premier lieu l'influence de l'action lyotrope des sels sur la courbe de résistance, et nous pouvons le faire le mieux en comparant la résistance en solution pure de *NaCl* à la résistance dans une solution de *NaCl* + *CaCl*₂, dans laquelle l'effet lyotrope est, comme nous le savons maintenant, diminué ou même annulé. Le tableau 1 donne un aperçu de cette comparaison. L'intensité de l'hémolyse est mesurée suivant la méthode d'ARRHÉNIUS ³⁾.

TABLEAU I. Globules rouges humains.

Composition du liquide de suspension	Commencement de l'hémolyse	Abaissement du point de congélation de la solution
Solution <i>NaCl</i> pure	0.53% <i>NaCl</i>	$\Delta = -0.315$
<i>NaCl</i> + 0.005% <i>CaCl</i> ₂ 6 aq.	0.52 "	0.310
" + 0.010 "	0.52 "	0.312
" + 0.015 "	0.45 "	0.290
" + 0.020 "	0.40 "	0.250
" + 0.022 "	0.44 "	0.275
" + 0.025 "	0.46 "	0.285
" + 0.030 "	0.53 "	0.317
" + 0.040 "	0.53 "	0.320

Il y a encore une autre façon de démontrer le même fait. Si l'on prépare un certain nombre de solutions qui contiennent toutes 0,51 % *NaCl* et de plus du *CaCl*₂. 6 aq. en diverses concentrations, et qu'on ajoute à toutes ces solutions 0,05 cm³. de sang humain, on obtient une hémolyse partielle qui n'est pas partout également énergique, et dont le rapport d'intensité est donné dans le tableau II.

¹⁾ STRAUB, *Verh. Deutsch. Naturf. u. Aerzte*, 1912, p. 1.

²⁾ MACALLUM, *Publ. Univ. California*, *Physiol.* II, p. 93.

³⁾ Au sujet du procédé opératoire voir BRINKMAN, *Bioch. Zeitschr.*, **95**, 101, 1919.

TABLEAU II.

Composition du liquide de suspension				Intensité de l'hémolyse
<i>NaCl</i> 0.51 ‰				15 ‰
	+	<i>CaCl</i> ₂ 6 aq. 0.005 ‰		10
"	+	"	0.010	5
"	+	"	0.015	0
"	+	"	0.020	0
"	+	"	0.022	0
"	+	"	0.025	5
"	+	"	0.030	15
"	+	"	0.040	20

Nous pouvons tirer de ces séries d'épreuves quelques conclusions très importantes pour notre recherche, mais nous ne nous en occuperons pas encore. Ce qui nous intéresse uniquement pour le moment, c'est la question, posée ci-dessus, de savoir si l'action lyotrope de la solution de *NaCl* pure a aussi de l'influence dans la détermination de résistance, et cette question, nous devons y répondre sans réserve par l'affirmative.

Nous voyons, en effet, que, lorsque la solution hypotonique de *NaCl* contient 0,020 ‰ de *CaCl*₂ 6 aq (une quantité physiologique), la résistance de la membrane des globules sanguins à l'hypotonie est devenue beaucoup plus grande qu'elle ne l'est en solution pure de *NaCl*. Le liquide avec calcium est certainement plus physiologique que le liquide qui en est exempt et nous devons donc conclure qu'une solution de *NaCl* pure a une action de diminution de la résistance des colloïdes de la membrane des globules sanguins, action que, d'après les analogies en chimie colloïdale, nous envisageons comme un effet lyotrope.

Il est donc clair pourquoi la résistance des globules sanguins diminue, lorsqu'on les lave dans une solution de *NaCl* pure, ainsi que SNAPPER l'a montré¹⁾. L'épreuve suivante illustre le fait:

0.080 cm³. de sang humain sont mis en suspension dans une solution de *NaCl* à 0.9 ‰ et centrifugés immédiatement; puis on y ajoute du *NaCl* à 0.47 ‰ et puis encore du *NaCl* à 0.46 ‰; ici l'hémolyse commence. Mais si, avant d'ajouter la solution hypotonique, on lave le sang encore une fois dans du *NaCl* à 0,9 ‰, l'hémolyse commence dans du *NaCl* à 0.50 ‰; si on lave trois fois dans du *NaCl* à 0.9 ‰ elle commence déjà à 0.53 ‰.

¹⁾ SNAPPER, *Biochem. Zeitschr.*, **51**, 62, 1913.

Le même phénomène se produit lorsqu'on laisse le sang pendant 1 heure dans du *NaCl* à 0,9 ‰. Après un long séjour dans cette solution ou après des centrifugations répétées on peut même voir se produire l'hémolyse dans du *NaCl* à 0,9 ‰.

LIEBERMANN et v. FILLINGER¹⁾ aussi trouvèrent que lorsqu'on agite avec précaution 0,05 cm.³ de sang humain pendant 2 minutes avec du *NaCl* à 0,5 ‰ il se produit une hémolyse, alors que cette hémolyse ne se produit jamais lorsqu'on opère rapidement dans le *NaCl* à 0,5 ‰. PASTEUR, VALLÉRY-RADOT et L'HÉRITIER²⁾ montrèrent que la résistance des globules sanguins de divers animaux diminue avec leur volume. Cela devient compréhensible si l'on songe que, lorsque le volume diminue, la surface devient relativement plus grande, donc aussi la surface par laquelle les globules sanguins viennent en contact avec la solution de *NaCl*, qui rend les colloïdes déliquescents.

Si nous nous demandons maintenant quelle est l'influence de cet effet lyotrope de la solution de *NaCl* pure, que nous venons de décrire, sur les propriétés de ce qu'on appelle la courbe de résistance, nous pouvons constater en premier lieu que le début de l'hémolyse doit dépendre du temps pendant lequel les globules sanguins non encore hémolysés ont séjourné dans la solution de *NaCl* pure. Si nous lisons p. ex. que CHAUFFARD et RENDU ont trouvé comme valeurs pour le commencement normal de l'hémolyse 0,42 à 0,38 ‰ *NaCl* alors que MAY donne 0,48 à 0,46 ‰, cette différence peut provenir tout simplement du fait que la durée du séjour dans la solution de *NaCl* n'a pas été la même. On voit donc combien il est difficile de juger de la valeur des résultats des différents auteurs, lorsqu'il n'y a pas d'unité dans la méthode.

Mais il y a encore d'autres faits, beaucoup plus importants. Le but de la détermination clinique de la résistance est de se faire une idée de l'image du sang rouge. La courbe de résistance doit exprimer le pourcentage des globules sanguins qui ont une résistance *A* et le pourcentage de ceux qui ont une résistance *B*. Il est clair que pour établir cela il est de toute nécessité que dans une solution hypotonique de concentration correspondant à *A* tous les globules qui ne supportent plus cette hypotonie s'hémolysent. Il faut alors que les globules restants puissent encore supporter l'hypotonie *A*.

¹⁾ LIEBERMANN et v. FILLINGER, *Deutsch. Med. Woch.*, 1912, n°. 10.

²⁾ PASTEUR, VALLÉRY-RADOT et L'HÉRITIER, *C.r. Soc. Biol.*, 1918, p. 370.

Si l'on porte donc les globules dans la solution hypotonique *A* il faut qu'il se produise une hémolyse partielle; si l'on centrifuge alors, qu'on enlève l'hémolysat et qu'on verse ensuite la même solution *A* sur les globules, il ne peut plus se produire d'hémolyse, puisque tous les globules qui ne supportent plus la concentration *A* doivent avoir disparu. Mais c'est le contraire qui a lieu, ainsi que le montre l'épreuve suivante:

On ajoute 0,080 cm³. de sang humain à 5 cm³. de *NaCl* à 0,9‰; on centrifuge immédiatement et on verse une solution de *NaCl* à 0,46‰ sur les globules ainsi séparés; les globules restent pendant 10 minutes dans cette solution. Il se produit ainsi, d'après ARRHENIUS, une hémolyse partielle de 10‰. On devrait donc conclure de là que 10‰ des globules sanguins ne pouvaient plus supporter l'hypotonie de 0,46‰ *NaCl*. Mais, si l'on sépare par centrifugation les 90‰ restants des globules et qu'on y verse de nouveau du *NaCl* à 0,46‰, il se produit de nouveau une hémolyse partielle, qui est encore de 10‰. Après une nouvelle centrifugation suivie d'une nouvelle dilution dans du *NaCl* à 0,46‰, il y a encore un hémolyse partielle de 5‰.

On voit donc d'après cela que l'intensité de l'hémolyse dans une solution hypotonique n'est pas du tout proportionnelle au nombre de globules sanguins qui ne peuvent plus supporter cette hypotonie et que pour cette raison la „courbe de résistance” ne donne pas une image exacte du pouvoir de résistance des divers globules sanguins.

Pour expliquer ce phénomène nous devons bien admettre que le contenu des globules sanguins hémolysés protège les autres globules, non encore hémolysés, contre la solution hypotonique *NaCl*. Je ne vois pas d'autre possibilité.

C'est pourquoi j'ai examiné quelle pouvait être la substance protectrice qui sort des globules et j'ai songé en premier lieu aux ions calcium. Nous savons, en effet, qu'en concentration minime ces ions sont capables de diminuer ou de contrebalancer l'influence lyotrope de la solution de *NaCl* pure.

Il est effectivement aisé de montrer que dans le produit de l'hémolyse de globules sanguins qui ont été lavés une seule fois au *NaCl* à 0,9‰ il y a une certaine concentration en ions *Ca*''.

Lorsqu'on lave notamment 0,080 cm³. de sang une fois au moyen de *NaCl* à 0,9‰ et qu'on en fait ensuite une suspension dans du *NaCl* à 0,50‰, il se produit une hémolyse partielle. Or, il suffit d'ajouter à 1 cm³. de cet hémolysat 0,01 cm³. de *Na₂C₂O₄* à 1‰ pour voir se former un trouble de *CaC₂O₄*; on calcule d'après cela une concentration d'ions de calcium de 0,08 mmol. par

litre ou 0,0017 % $CaCl_2$, 6 aq.¹⁾, une concentration qui certainement doit déjà avoir de l'influence sur le lyotropisme, ainsi que des expériences spécialement faites dans ce but l'ont appris. L'influence de 0,001 % $CaCl_2$ 6 aq. était tout aussi grande que celle de 0,005 % $CaCl_2$ 6 aq. (voir le tableau I). D'ailleurs, lors du lavage des globules dans le $NaCl$ à 0,9 % il passe déjà du calcium des globules dans le liquide de suspension²⁾, ce qui augmente encore la concentration des ions de calcium.

Il se peut évidemment que lors de l'hémolyse le contenu des globules sanguins mette en liberté d'autres substances encore, ayant aussi une action protectrice; mais la suite de nos recherches ne semble pas l'indiquer. En tous cas, il est certain que dans l'hémolyse partielle la quantité de Ca libérée est telle que les autres globules sanguins en sont protégés contre l'influence lyotrope du $NaCl$.

Quelle est maintenant l'influence du fait que je viens de décrire sur la forme de la courbe de résistance? Supposez que la résistance de tous les globules sanguins soit à peu près la même. Si l'on mettait ces globules dans une solution hypotonique produisant tout juste l'hémolyse, celle-ci n'aurait lieu que jusqu'au moment où il se serait libéré assez de contenu globulaire (calcium) pour protéger les autres globules contre cette hypotonie. Dans une solution un peu plus hypotonique le même phénomène se produirait; l'hémolyse se ferait de nouveau jusqu'à ce que le reste des globules fût protégé contre l'hypotonie existante. En d'autres termes, on obtient une courbe plus ou moins continue, une „échelle chromatique” pour les globules qui ont tous la même résistance.

On voit donc qu'inversement la courbe de résistance ne fournit pas du tout la preuve qu'il y a des globules de résistance différente. Pour obtenir une image fidèle de la résistance des globules sanguins, il est donc nécessaire d'avoir un liquide de suspension dans lequel la concentration des ions de calcium a une valeur physiologique et reste constante. En outre, on comprend sans plus que la concentration des ions H^+ de ce liquide doit être également physiologique et constante; l'influence de la concentration sur l'hémolyse est donc suffisamment connue.

Or, pour étudier de plus près ces concentrations d'ions il est nécessaire de pénétrer un peu plus avant la signification de l'essence et de la grandeur de la concentration des ions de calcium, d'autant plus qu'il règne encore beaucoup d'idées à mon avis inexactes à ce sujet.

¹⁾ BRINKMAN et VAN DAM, *Proceed. Acad. Amst.*, **22**, n°. 7, 1919.

²⁾ HAMBURGER, *Zeitschr. f. physik. Chem.*, **69**, 663.

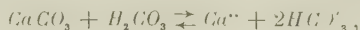
II. LA SIGNIFICATION GÉNÉRALE ET LA GRANDEUR DE LA CONCENTRATION DES IONS CALCIUM.

Les recherches récentes ont fourni de nombreux renseignements concernant la grande signification fonctionnelle des ions de calcium, tant au point de vue de la physiologie générale qu'au point de vue de la pharmacologie et de la clinique, de sorte que nous pouvons comparer leur importance à celle des ions H . Mais, tandis que l'étude de la concentration des ions d'hydrogène a été poussée d'une manière strictement systématique dans une voie physico-chimique, nous ne trouvons rien d'une analyse physico-chimique analogue dans l'étude de l'action du calcium. Et pourtant j'ai trouvé ici aussi une grande sensibilité à la concentration des ions Ca^{++} et une tendance à la constance de cette concentration physiologique des ions de calcium. Voilà pourquoi je désire donner ici rapidement un aperçu de la grandeur de la concentration des ions de calcium, des facteurs dont elle dépend et de la signification physiologique de cette concentration. Cela expliquera en même la composition de notre liquide servant à la détermination de la résistance.

Dans un liquide qui, au point de vue de sa composition saline, correspond au sérum la concentration des ions de calcium dépend de la solubilité de $CaCO_3$ dans ce liquide. Ce sel est, en effet, le moins soluble de tous ceux qui existent dans une pareille solution. Si la concentration du $CaCO_3$ non dissocié est λ , nous pouvons écrire, pour la quantité totale de calcium dissoute :

Calcium total = $\lambda + [Ca^{++}]$, $[Ca^{++}]$ étant la concentration des ions de calcium libre.

$[Ca^{++}]$ dépend de la concentration des ions d'hydrogène; nous avons notamment dans le sérum :



donc

$$\frac{CaCO_3 \cdot H_2CO_3}{[Ca^{++}] \cdot (HCO_3')^2} = K \quad (1)$$

ou bien aussi, comme

$$K_1 [H^+] = \frac{H_2CO_3}{[HCO_3']},$$

$$\frac{K_1 [H^+]}{[Ca^{++}] [HCO_3']} = K$$

ou

$$[Ca^{++}] = \frac{K_1}{K} \cdot \frac{[H^+]}{[HCO_3']}$$

ou encore

$$[Ca^{++}] = K \frac{[H^+]}{[HCO_3']^2},$$

où $K = 350$ à 18° .

Ce $[Ca^{++}]$ est presque égal à la solubilité totale du calcium dans le sérum, puisque la solubilité du $CaCO_3$ non dissocié est négligeable.

¹⁾ RONA et TAKAHASHI, *Biochem. Zeitschr.*, **49**, 370.

Cette formule est de la plus haute importance pour l'étude des actions du calcium; on peut en déduire les règles suivantes:

1. La concentration des ions calcium ($[Ca^{++}]$) est directement proportionnelle à $[H^+]$;
2. Le $[Ca^{++}]$ est inversement proportionnel à $[HCO_3']$;
3. Le $[Ca^{++}]$ ne dépend pas directement de la quantité totale de sels de calcium, à condition qu'il y ait une quantité suffisante de ces sels dans le liquide.

Dans le sang humain, pour une tension alvéolaire de CO_2 de 40 mm., $[H^+] = 0,46.10^{-7}$, $[HCO_3'] = 0,02$ norm. et $[Ca^{++}] = 30$ mgr. p. litre. Pour contrôler ce calcul nous avons déterminé, dans de l'ultrafiltrat de sérum humain qui avait un $[H^+] = 0,45.10^{-7}$, le $[Ca^{++}]$ d'une manière toute différente¹⁾. Nous avons trouvé une valeur de 32 mgr. p. l., ce qui s'accorde donc bien avec le résultat précédent.

Dans le sérum de sang humain il y a en tout 110 mgr. de calcium, dont 25 % ne sont pas diffusibles. On voit donc que normalement il y a en solution dans le sérum trois fois plus de composés du calcium diffusibles (sous forme de $Ca(HCO_3)_2$) que la quantité calculée. Cet excès de calcium doit donc se trouver en solution sursaturée: de pareilles solutions métastables de $Ca(HCO_3)_2$ se forment très aisément, surtout dans le sérum.

On n'a pas encore une idée très précise de l'état dans lequel se trouvent les 25 % de calcium non diffusibles. D'après RONA et TAKAHASHI, PAULI, HOFMEISTER, ROBERTSON, une combinaison du calcium avec l'albumine est la plus probable, mais on ne sait pas si c'est une combinaison d'adsorption ou une liaison électro-chimique. En tous cas la combinaison s'ionise facilement; cela est prouvé par le fait que tout le calcium du sérum peut être précipité au moyen d'oxalate d'ammonium. Si donc la quantité de calcium diffusible dans le sérum baisse considérablement il faut que les composés de calcium indiffusibles fournissent aussi des ions Ca^{++} .

Il y a donc toujours dans le sérum un grand excès de calcium pour rendre possible une augmentation éventuelle de la concentration des ions de calcium libres; mais nous avons vu que cette concentration des ions libres ne dépend pas directement de la concentration totale du calcium.

Nous devons maintenant examiner de plus près quels sont les facteurs qui déterminent cette concentration des ions. Il résulte de la formule donnée ci-dessus que ces facteurs sont le $[H^+]$ et le $[HCO_3']$ du plasma. Comme ces facteurs sont fort constants pour un sérum normal, il s'ensuit que le $[Ca^{++}]$ d'un sérum normal est également très constant et ne dépend pas directement des fluctuations dans l'apport de calcium; *l'organisme contient donc un système tampon tout aussi bien pour les ions Ca^{++} que pour les ions H^+ .*

Nous devons encore faire observer à ce propos qu'on peut démontrer théoriquement — et l'expérience le confirme — que le système tampon $H^+ (HCO_3') H_2CO_3$ a son effet régulateur le plus faible lorsque la réaction est neutre. Il est par là clair que, tandis que d'un côté le système tampon garantit une bonne fixation du domaine de concentration physiologique des ions H^+ , de petites variations

¹⁾ BRINKMAN et VAN DAM, *loc. cit.*, p. 8.

peuvent, d'un autre côté, se produire aisément dans les limites de ce domaine.

Par suite de la légère variabilité de la tension de CO_2 dans le sang il peut se produire de cette façon une variation de $[H^+]$ de 36%. Une petite variation de $[Ca^{++}]$ est également possible de cette manière, de sorte que cette concentration n'est pas tout à fait constante.

Comme le $[H^+]$ reste très longtemps constant, même dans des cas pathologiques, les variations anormales de $[Ca^{++}]$ doivent surtout dépendre des fluctuations de $[HCO_3^-]$; il est donc nécessaire d'avoir une idée des écarts que cette dernière concentration peut présenter.

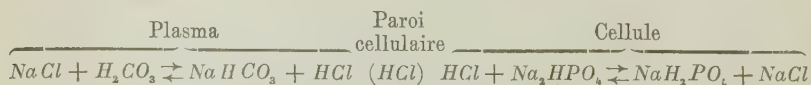
La concentration du bicarbonate dans le plasma sanguin est un indicateur de la quantité d'alcali qui est encore disponible pour la neutralisation; c'est la réserve d'alcali du corps. Normalement la concentration en bicarbonate est fort constante et toute diminution de cette concentration signifie qu'il y avait une quantité anormale d'acide qui devait être neutralisée. La baisse de la concentration de bicarbonate est la seule mesure exacte de ce qu'on appelle l'acidose. Envisagée de cette façon, l'acidose est donc un phénomène tout aussi nettement susceptible de mesure que la fièvre, la tachycardie etc.

On sait qu'une production anormale d'acide n'a pas pour conséquence une augmentation de $[H^+]$, mais simplement une baisse de $[NaHCO_3]$, une acidose. Mais, d'après ce que nous venons de voir à la p. 17, cette diminution est accompagnée d'une augmentation de $[Ca^{++}]$. Nous pouvons donc dire que *l'acidose ne consiste pas en une augmentation de $[H^+]$, mais en une augmentation de $[Ca^{++}]$* . Tous les véritables états acidotiques doivent avoir pour conséquence une élévation du $[Ca^{++}]$.

L'influence du H_2CO_3 libre sur le bicarbonate du plasma n'est pas grande. Pour les conditions réalisées dans le sang l'équilibre $2NaHCO_3 \rightleftharpoons Na_2CO_3 + H_2CO_3$ est déplacé si loin du côté du 1^{er} membre que pratiquement il ne reste plus que du $NaHCO_3$, même si la tension de CO_2 est très faible (BOHR).

Mais il y a d'autres systèmes en équilibre qui sont un peu plus sensibles aux variations de la tension de l'anhydride carbonique. Le principal de ces systèmes est $NaHCO_3 + \text{albumine} \rightleftharpoons H_2CO_3 + \text{protéide de Na}$; celui-ci fait baisser la concentration de bicarbonate de 7% lorsque la tension de CO_2 tombe de 43 mm. à 17 mm. de mercure. Ici encore l'influence de la tension de CO_2 est donc faible.

Pour le sang total on doit tenir compte en outre de l'influence que le CO_2 exerce sur les rapports d'ions entre le plasma et les globules sanguins. Ces déplacements, physiologiquement importants, ont été étudiés principalement par HAMBURGER. Cet auteur a montré qu'à la neutralisation de l'acide ne sert pas seulement le bicarbonate du plasma mais encore les sels de la cellule (Na_2HPO_4 , K_2HPO_4), p. ex. suivant le schéma:



Le Na_2HPO_4 neutralisant ne peut pas quitter la cellule assez rapidement, mais l'acide pénètre par diffusion dans la cellule et y est neutralisé. D'après

VAN SLIJKE cet effet, dû à la perte en CO_2 que subit le sang lorsqu'on le recueille dans un vase ouvert, a pour conséquence une diminution de $NaHCO_3$ de 5%.

Nous devons donc dire qu'en général les fluctuations de la tension de CO_2 doivent avoir pour conséquence de petites variations de la concentration de $NaHCO_3$. Comme la concentration en bicarbonate du sang veineux est par là plus élevée de 5% en moyenne que celle du sang artériel, le $[Ca^{++}]$ du sang artériel serait plus élevé de 5% que celui du sang veineux. Mais, par suite de la tension variable du CO_2 , le $[H^+]$ présente des fluctuations qui peuvent atteindre 36% (voir p. 18). C'est ainsi que, d'après VAN SLIJKE, le p_H du sang artériel est 7.44, celui du sang veineux 7.41, ce qui est donc une différence de 8% dans la concentration des ions d'hydrogène; c'est à dire que le $[H^+]$ du sang artériel est plus petit de 8%. En définitive, le $[Ca^{++}]$ du sang artériel est donc encore plus petit de 3% que le $[Ca^{++}]$ du sang veineux.

Nous devons encore examiner quelle est l'influence de l'addition des sels de calcium au plasma sur le $[Ca^{++}]$. Aussi longtemps que $[H^+]$ et $[HCO_3^-]$ restent constants l'addition de calcium ne peut rien changer au $[Ca^{++}]$; les sels de calcium sont tous transformés en $Ca(HCO_3)_2$ non dissocié. Mais il faut pour cela du HCO_3^- , qui est donc soustrait au système. Le sel de calcium agit donc comme un acide bivalent et donne lieu à une acidose; il en résulte une augmentation de $[Ca^{++}]$, dont la grandeur peut être aisément calculée.

Nous devons encore faire observer que lors d'une injection intraveineuse de sel de calcium le $[Ca^{++}]$ doit monter considérablement pendant quelques instants, parce que les équilibres ont besoin d'un certain temps pour s'établir.

Comme conclusion de ces considérations nous pouvons donc dire que le seul facteur qui influence le $[Ca^{++}]$ du sang est la concentration de $NaHCO_3$. Une augmentation du $[Ca^{++}]$ est toujours produite par une acidose; l'apport de sels de calcium aussi a uniquement de l'effet sur le $[Ca^{++}]$ parce qu'il donne lieu à une acidose.

Nous en venons maintenant à la signification physiologique du $[Ca^{++}]$. Ainsi que je l'ai déjà fait observer, l'ion de calcium ne manque dans aucun liquide physiologique. Il n'est pas possible de donner ici un aperçu quelque peu complet des actions de l'ion Ca ; je dois me contenter de renvoyer aux travaux qui résument la question.

Les liaisons des cellules, les rapports synaptiques entre cellules (excitabilité des muscles, action du nerf vague, excitabilité réflexe, mouvements péristaltiques), les phénomènes de perméabilité (organes unicellulaires, absorption de poisons et de substances colorantes par les cellules végétales, absorption d'oxygène par les cellules, perméabilité de cellules du foie et de la membrane glomérulaire à la glycose, influence sur l'exsudation, phénomènes d'hémolyse, narcose etc.) sont tous régis plus ou moins par la concentration des ions de calcium et de plus en plus il est clair que toutes ces actions peuvent s'expliquer par l'influence colloïdo-chimique de cet ion sur les colloïdes hydrophiles.

Mais il y a un point sur lequel je désire insister. Dans l'énorme bibliographie on revient toujours sur l'effet d'une concentration trop basse des ions de calcium,

alors qu'il y a peu de recherches systématiques sur l'influence d'un $[Ca^{++}]$ trop élevé. Il y a bien de nombreuses recherches pharmacologiques sur l'action de la chaux¹⁾ comme conséquence d'une forte addition de sel de Ca , mais on n'y fait pas attention à la concentration des ions de calcium; KEITH LUCAS et GÜTHLIN considèrent la concentration des ions de calcium dans le liquide de Ringer ordinaire comme trop élevée pour le cœur de grenouille, mais il ne donnent pas une analyse précise de l'influence du $[Ca^{++}]$.

Une idée nette de la signification de la grandeur et de la constance du $[Ca^{++}]$ est donnée par les recherches de HAMBURGER et BRINKMAN¹⁾ sur la perméabilité à la glycose de la membrane glomérulaire de la grenouille. Ces auteurs prouvent par leurs expériences:

1°. que l'imperméabilité normale de la membrane glomérulaire à la glycose n'existe que lorsque le $[Ca^{++}]$ du liquide de perfusion a une valeur bien déterminée;

2°. que ce $[Ca^{++}]$ déterminé s'établit automatiquement et se rétablit, pourvu que le $[H^+]$ et le $[HCO_3^-]$ du liquide de perfusion aient une valeur physiologique.

Un deuxième exemple est fourni par l'influence — dont il a déjà été question — du $[Ca^{++}]$ sur la résistance des globules rouges du sang. Il résulte des tableaux des pages 11 et 12 que si l'on ajoute une concentration de 3 à 4 mgr. d'ions Ca^{++} libres par litre à la solution de $NaCl$ pure la résistance devient déjà plus grande; elle est maximum pour une concentration de 13 mgr. de Ca^{++} par litre, mais pour une concentration de 15 mgr. par litre elle diminue déjà et descend rapidement au niveau de la solution de $NaCl$ pure.

On est encore parvenu à démontrer cette influence générale de la grandeur du $[Ca^{++}]$ du liquide de perfusion ou du sang dans l'étude de l'action du nerf vague sur le mouvement de l'estomac et la sécrétion gastrique chez la grenouille, dans les mouvements automatiques du cloaque de la grenouille et dans l'excitabilité galvanique du nerf péronier du lapin. Dans tous ces cas on a constaté que la fonction physiologique est liée à la présence d'un $[Ca^{++}]$ bien déterminé, constant.²⁾

On comprendra donc qu'en composant rationnellement une solution de suspension pour l'examen de la résistance osmotique nous avons visé à donner à cette concentration des ions de calcium la valeur physiologique et à rendre cette valeur autant que possible constante pendant la détermination. Ainsi que je l'ai indiqué ci-dessus la concentration des ions Ca^{++} libres dans le sang de mammifère est donnée par la grandeur du rapport $\frac{H_2CO_3}{HCO_3^-}$. Il suffisait donc de satisfaire aux

conditions que la tension de l'anhydride carbonique et la concentration des ions de bicarbonate eussent et conservassent une valeur physiologique, pour que le $[Ca^{++}]$ aussi fût physiologique et constant et ne dépendît plus de la quantité totale de calcium. C'est pourquoi nous avons augmenté jusqu'à 0,2% la teneur en $NaHCO_3$ du liquide de Ringer ordinaire et nous avons fait passer du CO_2 à

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.*, 88, 97, 1918.

²⁾ Voir HAMBURGER, *Lancet*, l. c., p. 3.

travers la solution jusqu'à ce que le $[H^+]$ du liquide fût $0,45 \cdot 10^{-7}$, ce qui est le $[H^+]$ correspondant à une tension de CO_2 alvéolaire. La mesure directe aussi bien que le calcul montrèrent que dans ce liquide le $[Ca^{++}]$ était $350 \times \frac{0,45 \cdot 10}{0,02}$

mmol., ou 30 mgr. d'ions Ca^{++} libres par litre, une concentration qui est bien d'accord avec la détermination directe dans le sérum clair ou dans l'ultrafiltrat.

Pour que le balancement soit parfait, la solution contient encore 0,01 % KCl , une concentration qui, toutefois, n'a pas une bien grande importance au point de vue de l'équilibre. La concentration totale des sels de calcium est assez indifférente, à condition qu'il y ait au moins 0,015 % $CaCl_2 \cdot 6 aq.$

III. LA RÉSISTANCE DES GLOBULES ROUGES DANS DES SOLUTIONS SALINES À CONCENTRATIONS PHYSIOLOGIQUES DES IONS $[H^+]$, $[HCO_3^-]$ ET $[Ca^{++}]$. SOLUTIONS CONVENANT À DES BUTS CLINIQUES.

Ainsi que je viens de le décrire dans le chapitre précédent il est nécessaire, pour un examen rationnel de la résistance osmotique, de se servir d'un liquide où les concentrations des ions H^+ , HCO_3^- et Ca^{++} sont physiologiques et constantes. J'ai fait usage, comme solution la plus simple, d'un liquide ayant la composition suivante: $NaCl$ 0,7 %, $NaHCO_3$ 0,2 %, KCl 0,01 %, $CaCl_2 \cdot 6 aq.$ 0,02 %, et du CO_2 en quantité telle que le $[H^+]$ fût $= 0,45 \cdot 10^{-7}$. Cette dernière concentration peut être établie le plus simplement par la méthode des indicateurs (rouge neutre) de SÖRENSEN.

Le liquide ci-dessus est à peu près isotonique au sérum; les solutions hypotoniques nécessaires furent obtenues exclusivement en abaissant la teneur en $NaCl$. Les concentrations de $NaHCO_3$, KCl , $CaCl_2 \cdot 6 aq.$, H_2CO_3 et $[H^+]$ étaient donc les mêmes pour toutes les solutions.

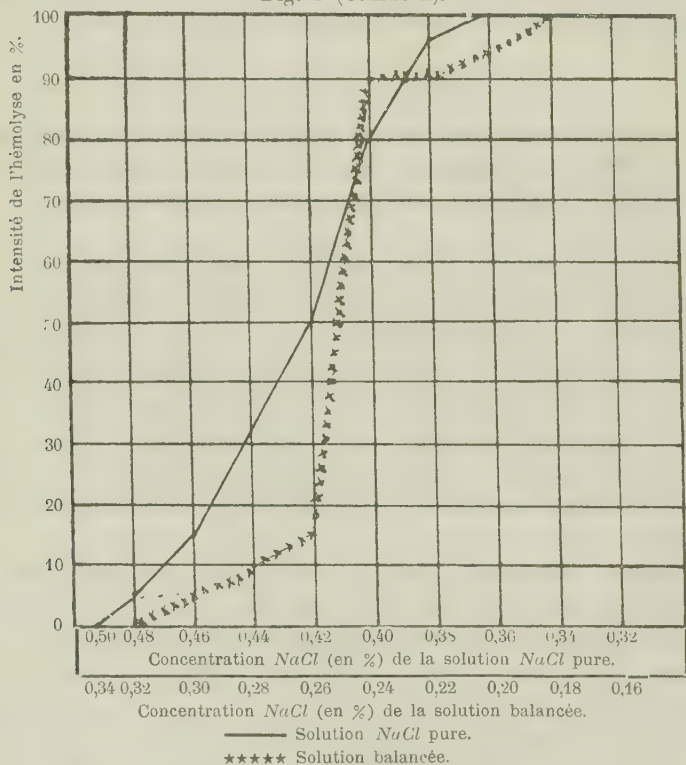
Les liquides furent préparés à partir de solutions étalons de $NaCl$, $NaHCO_3$, KCl et $CaCl_2 \cdot 6 aq.$ Le point le plus difficile à réaliser est la constance de la tension de l'acide carbonique, un point pourtant très important, car de cette tension dépendent le $[H^+]$ et le $[Ca^{++}]$. Voilà pourquoi toutes les solutions furent conservées sous une couche d'huile de paraffine dans des bouteilles munies de siphons et la détermination de résistance se fit dans des tubes complètement remplis, de 2 cm³. de capacité et munis de bouchons en verre coniques et rodés. Ce n'est que de cette façon qu'il fut possible d'éviter des pertes de CO_2 .

Malgré cela je reconnus qu'il était nécessaire de contrôler journellement, au moyen de rouge neutre, le $[H^+]$ des liquides examinés. Lorsque le $[H^+]$ était trop bas, j'y faisais passer du CO_2 ; était-il trop élevé, je chassais un peu de CO_2 au moyen d'un courant d'air.

Ensuite, il fallut évidemment prendre, dans la détermination, les précautions ordinaires; c'est ainsi que le rapport des quantités de sang et de liquide de suspension devait être constant, etc. Je n'entrerai pas dans des détails à ce sujet et me contenterai de renvoyer à la description développée de HAMBURGER dans le Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.

Lorsqu'on étudie la résistance des globules sanguins rouges dans cette solution équilibrée, on constate que l'effet perturbateur lyotrope de la

Fig. 1 (Courbe I).



solution *NaCl* pure, dont la signification fut exposée au chapitre 1^{er}, a disparu. On s'en aperçoit le plus facilement en faisant avec cette solution l'expérience décrite à la page 14. Si l'on déverse notamment l'hémolysat après une hémolyse partielle et qu'on verse ensuite sur les globules restants une solution hypotonique de même concentration, il ne se produit pas une nouvelle hémolyse. Une hémolyse partielle de 20 % *p. ex.* signifie donc réellement que 20 % des globules ne peuvent plus supporter le degré d'hypotonie employé.

Comme conséquence directe de cette correction l'image de l'hémolyse graduellement plus forte a disparu. J'ai déjà dit au chapitre 1^{er} que cette échelle chromatique est probablement un produit artificiel; aussi n'observe-t-on plus ce phénomène lorsqu'on fait l'examen dans la solution balancée. La différence entre la courbe de résistance en solution *NaCl* pure et dans le liquide décrit ici est donnée par la courbe I (fig. 1) qui peut servir d'exemple général d'hémolyse osmotique de globules sanguins humains.

Par cette figure, qui a été construite comme exemple d'un très grand nombre de déterminations faites sur du sang humain normal, on voit que la courbe de résistance dans des solutions salines balancées a une forme en *S* très prononcée, ainsi que MAY l'a déjà fait observer ¹⁾. Conformément aux conceptions actuelles, que nous avons pu pleinement confirmer, nous devons donc partager l'image du sang rouge en 3 fractions, qui ne passent toutefois pas continûment l'une dans l'autre, savoir:

1. 10 à 15 % des globules sanguins, à faible résistance, que l'on appelle généralement *les plus vieux*. Par globules sanguins les plus vieux on doit donc entendre ceux qui sont le plus près de l'hémolyse;
2. 80 à 90 % des globules sanguins, à résistance moyenne;
3. 5 à 10 % des globules, à grande résistance, que l'on considère à bon droit comme *les plus jeunes*, c. à d. les cellules le plus récemment entrées dans le plasma. La grandeur de cette dernière fraction nous donne donc une idée de l'intensité de la *régénération*.

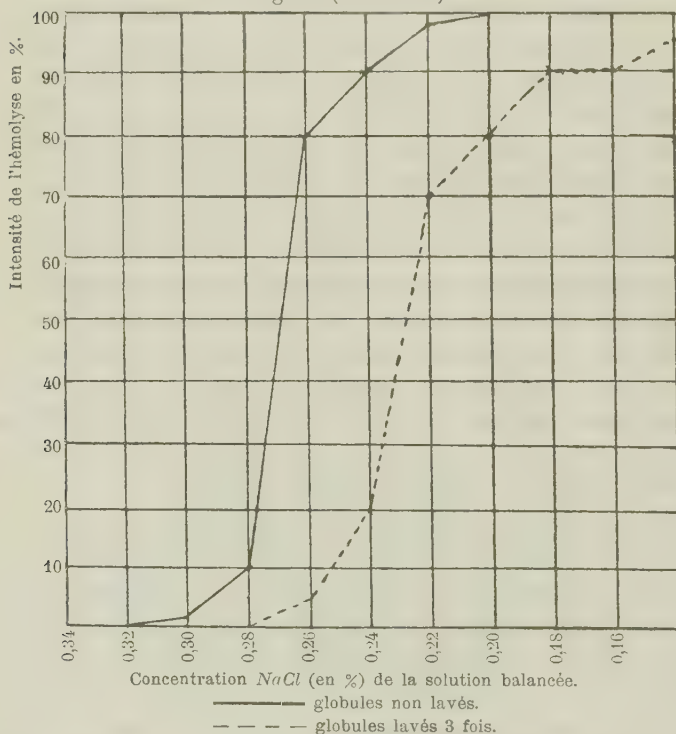
Mais le changement dans la courbe de résistance, dont nous venons de parler, ne constitue pas encore la principale différence entre les façons dont les globules sanguins se comportent dans une solution *NaCl* pure et dans une solution saline balancée. On trouve la différence capitale en enlevant le plasma sanguin par un lavage répété des globules sanguins. J'ai déjà dit dans le chapitre 1^{er} que par le lavage dans une solution de *NaCl* la résistance devient beaucoup plus faible; le résultat uniforme de centaines de déterminations faites sur le sang de l'homme, du lapin, du bœuf, du porc, du mouton, du cheval, de la souris, de la poule et de la grenouille est qu'un lavage répété dans une solution saline balancée augmente régulièrement la résistance. La courbe II (fig. 2) donne un exemple de la résistance de globules humains non lavés et de globules lavés 3 fois.

¹⁾ E. MAY. Thèse, Paris, 1914.

J'ai établi que la cause de cette augmentation de résistance est l'enlèvement par le lavage de lipoides à action normalement hémolytique, tapissant la surface des globules. Ces lipoides sont bien lavés aussi dans une solution *NaCl* pure, mais alors l'augmentation de résistance qui est la conséquence de l'enlèvement de ce complexe hémolytique est surpassée par la diminution de résistance causée par la solution de *NaCl*.

L'augmentation de résistance ainsi trouvée, produite par le lavage d'un

Fig. 2. (Courbe II).



complexe lipéide de la surface de la cellule, constitue le point de départ de nos recherches suivantes, qui conduiront à une analyse des causes de l'hémo lyse physiologique normale et pathologique in vivo. Elle sera traitée dans les chapitres suivants.

En résumé, les propriétés par lesquelles notre solution saline balancée diffère d'une solution *NaCl* pure sont:

1°. L'augmentation de résistance par un lavage répété (déplasmatisation).

2°. La disparition de l'„échelle chromatique”.

D'après les considérations des chapitres I et II ces résultats doivent être regardés comme plus „physiologiques” que ceux obtenus jusqu'ici dans les déterminations de résistance. Le fait qu'une détermination de résistance des globules de sang de bœuf dans l'ultrafiltrat (dilué) de sang de bœuf et des globules du sang de cheval dans l'ultrafiltrat de ce même sang fournit exactement la même courbe de résistance que la détermination dans notre solution balancée, constitue un appui sérieux pour notre manière de voir.

C'est une chose qui a son importance pratique que la préparation et surtout la conservation de cette solution balancée demande de l'attention et de la patience, parce que la tension du CO_2 (et en même temps le $[H^•]$ et le $[Ca^{**}]$) doivent être contrôlés tous les jours. Ainsi que je l'ai déjà dit plus haut, les solutions sont conservées dans des bouteilles à siphon sous une couche d'huile de paraffine, et la détermination s'effectue dans des tubes bouchés, complètement remplis; néanmoins un contrôle journalier de la concentration des ions d'hydrogène (au rouge neutre) est indispensable surtout pendant l'été. La couche d'huile recouvrant les solutions n'empêche pas à la longue le départ de CO_2 , parce que ce gaz est encore plus soluble dans l'huile que dans l'eau.

Voilà pourquoi j'ai cherché, dans le but de simplifier la méthode, un système d'ions où la concentration des ions d'hydrogène reste plus longtemps constante, de sorte qu'il ne serait pas nécessaire d'apporter chaque fois une correction à la tension de CO_2 . Le moyen tout indiqué pour arriver à ce but est d'ajouter un mélange de phosphates primaires et secondaires, ainsi que cela a déjà été fait par MICHAËLIS et GARMENDIA¹⁾. On se rappellera que SÖRENSEN introduisit le système Na_2HPO_4 . 2aq. et KH_2PO_4 comme système tampon, afin de conserver une concentration déterminée des ions $H^•$.

J'ai pris une solution balancée contenant les phosphates dans le rapport phosph. sec.: phosph. prim. = 5.6 : 1²⁾. On obtient avec cette solution la même courbe de résistance et effectivement la constance de la concentration des ions $H^•$ se maintient un peu plus longtemps. Seulement, la „valeur comme tampon”, le pouvoir régulateur du $[H^•]$ d'un pareil système est le plus petit dans le cas d'une réaction neutre, ainsi

¹⁾ MICHAËLIS et GARMENDIA, *Biochem. Zeitschr.*, **67**, 431.

²⁾ Voir HAMBURGER, *Biolog. Arbeitsmethoden*.

qui cela a été démontré par HASSELBACH; il n'était pas possible de donner aux phosphates une concentration plus élevée, parce que la pression osmotique aurait alors été trop forte, de sorte que ce liquide-là même ne gardait pas son $[H^+]$ plus longtemps que quelques jours. D'ailleurs la préparation des solutions n'est pas aussi simple qu'il serait à désirer pour un but clinique.

En même temps que je cherchais à réaliser, pour mes recherches de résistance, une solution plus simple, et pourtant balancée au point de vue physico-chimique, HAMBURGER fut conduit à se servir d'une solution plus simple par une toute autre voie.

Depuis longtemps HAMBURGER aussi considérait une solution pure de $NaCl$ comme moins bien appropriée, parce qu'elle ne contient que des ions monovalents; or, comme conséquence de la perméabilité aux ions, démontrée par lui, il doit se produire des échanges, p. ex. de 2 Cl^- contre 1 HPO_4^{2-} , de sorte que la concentration totale primitive des ions dans le globule sanguin doit augmenter, et par là la résistance osmotique doit changer ¹⁾. Il était donc tout indiqué que le liquide servant à l'examen devait contenir aussi des ions bivalents, et c'est ainsi qu'une solution de Na_2SO_4 fut examinée comme milieu de suspension. HAMBURGER constata que les courbes de résistance dans la solution saline balancée et dans une solution de sulfate de sodium à concentration en ions d'hydrogène physiologique étaient identiques. Et aussi lors du lavage des globules sanguins il constata une augmentation analogue de la résistance, basée sur le lessivage des lipoides hémolytiques. Il était ainsi prouvé expérimentalement que la solution saline équilibrée, assez compliquée, pouvait être remplacée par une simple solution de Na_2SO_4 . Je ne puis entrer dans des développements concernant la théorie de cette possibilité de substitutions mais la pratique l'a suffisamment démontrée.

La seule difficulté, qui restait encore était celle-ci, que parfois la réaction de la solution de sulfate est trop fortement acide, de sorte qu'il devient nécessaire de priver d'anhydride carbonique l'air qui se trouve au-dessus de la solution. Pour rendre constante une fois pour toutes la concentration des ions d'hydrogène, nous avons finalement remplacé les solutions de sulfate par un autre système d'ions monovalents et bivalents, savoir le mélange neutre de phosphates de SÖRENSEN, qui se compose pour un quart environ d'ions HPO_4^{2-} . On peut, partant de deux solutions

¹⁾ Voir HAMBURGER, *Lancet*, loc. cit.

étalons équimolaires de Na_2HPO_4 2aq. et KH_2PO_4 , préparer une solution étalon du mélange de phosphates ($8\frac{1}{2}$ phosph. sec. et $1\frac{1}{2}$ phosph. prim.), à partir de laquelle on peut obtenir, par simple dilution, les liquides d'examen de concentrations graduellement plus basses. Le $[H^*]$ de ces solutions reste constant et la courbe de résistance est tout à fait indentique à celle dans une solution saline balancée ou un ultrafiltrat dilué. L'augmentation de la résistance par lavage est aussi exactement la même que dans la solution saline la plus physiologique.

La dilution des solutions salines successives fut faite jusqu'ici de manière à avoir une *différence* constante des concentrations en sel. Cette méthode ne fournit donc pas une *proportionnalité* entre les concentrations des solutions salines successives. Voilà pourquoi il nous sembla préférable d'appliquer ici aussi le principe du „physiologische Reihenversuch”, qui consiste à faire varier la dilution des solutions successives suivant une progression géométrique. Comme „liquide de lavage isotonique” j'ai choisi un mélange de phosphates neutre physiologique, où le volume des globules sanguins restait exactement égal au volume dans le plasma. Cette solution est caractérisée par un abaissement du point de congélation de $-0^{\circ},46$. La concentration est de 16,30 gr. Na_2HPO_4 2aq. + 2,18 gr. KH_2PO_4 par litre.

Les solutions hypotoniques furent préparées en diluant jusqu'à la demi-concentration les solutions isotoniques et en faisant à partir de là les dilutions $0,9 \times \frac{1}{2}$ isotonique, $(0,9)^2 \times \frac{1}{2}$ isot, $(0,9)^3 \times \frac{1}{2}$ isot. etc. J'ai obtenu ainsi la série de liquides suivantes.

Isotonique $\Delta = -0^{\circ},46$ (liquide de lavage)					
$\frac{1}{2}$	"	"	-0,231	$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ isotonique	$\Delta = -0^{\circ},153$
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$	"	"	-0,210	$(\frac{9}{10})^5 \times \frac{1}{2}$	" " -0,134
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$	"	"	-0,186	$(\frac{9}{10})^6 \times \frac{1}{2}$	" " -0,120
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$	"	"	-0,167	$(\frac{9}{10})^7 \times \frac{1}{2}$	" " -0,109
				$(\frac{9}{10})^8 \times \frac{1}{2}$	" " -0,099

Après avoir indiqué ainsi la composition d'une solution mieux appropriée, à mon avis, à la détermination de la résistance osmotique, nous avons à examiner ce que ce liquide peut nous apprendre au sujet de la nature de l'image du sang rouge. Les questions les plus importantes auxquelles la courbe de résistance doit nous donner une réponse sont les suivantes:

1°. *Quelle est la proportion des globules sanguins qui manifestent une tendance à une hémolyse plus forte que chez les autres cellules*

et à quel degré ces globules sont-ils déjà approchés de la dissolution?

2°. Quelle est la grandeur de l'influence hémolysante qui s'exerce sur les globules sanguins?

3°. Quelle est l'intensité de la régénération?

Pour pouvoir donner une réponse à ces questions, nous devons nous servir de deux courbes de résistance, savoir de celle de globules sanguins qui sont ajoutés immédiatement aux solutions hypotoniques et de celle de globules qui ont été lavés trois fois dans la solution isotonique. Ce n'est qu'à l'aide de ces deux courbes que nous obtenons une réponse aux questions posées. Au sujet de l'emploi de globules sanguins lavés ou non les écoles de WIDAL et de VAQUEZ diffèrent d'avis en principe. WIDAL, ADAMI et BRULÉ ne se servent que de globules qui ont été lavés dans une solution isotonique d'oxalate de potassium, pour éliminer le „pouvoir protecteur du sérum”; VAQUEZ et RIBIERRE ajoutent le sang tel quel directement à la solution hypotonique ¹⁾.

Evidemment, chacun des deux procédés a ses avantages. Il est clair que si l'on veut connaître la résistance des globules sanguins circulant dans le plasma ceux-ci doivent être ajoutés à la solution saline dans leur milieu naturel. Le lavage des globules dans une solution de NaCl n'est donc pas du tout permis, parce que nous savons que leur résistance est considérablement diminuée par ce lavage. Mais le lavage dans une solution isotonique de $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, du moins si l'on opère rapidement, ne diminue pas la résistance, ainsi que WIDAL et BRULÉ l'ont déjà établi. Mais il est caractéristique pour le lavage dans une solution physiologique équilibrée que la résistance change — elle devient notamment plus grande — par suite du lessivage des lipoides à action hémolysante qui sont concentrés à la surface de la cellule. Les globules sanguins lavés dans cette solution sont privés de leur „couche lipoidique” et leur courbe de résistance fait connaître la résistance osmotique que possède le globule qui n'est pas encore soumis à l'influence des lipoides du plasma.

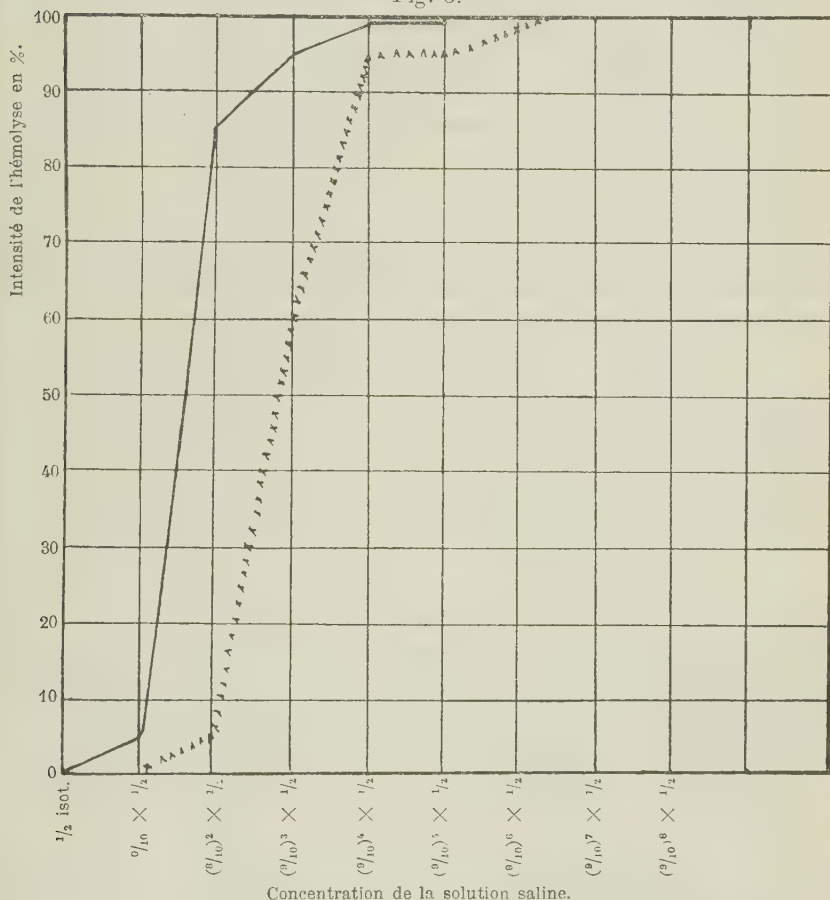
Nous pouvons donc dire en général que la courbe des globules lavés donne une image de la résistance des érythrocytes, tels qu'ils viennent de la moelle osseuse, tandis que la courbe des cellules non lavées reflète les rapports qui existent dans le sang circulant. La fig. 3 donne l'image générale pour le sang humain normal.

¹⁾ Voir E. MAY, Thèse, Paris, 1914.

Quelques exemples typiques serviront à illustrer l'usage qu'on peut faire des courbes.

Pour obtenir des globules qui ont certainement une tendance plus

Fig. 3.



Courbes de résistance de globules sanguins normaux de l'homme, non lavés (—) ou lavés 3 fois (*****). Les déterminations ont été faites dans des solutions de phosphate dont la dilution varie en progression géométrique.

que normale à se dissoudre on pourrait se servir de malades souffrant d'affections essentiellement hémolytiques; le sang de la veine de la rate présente aussi la propriété cherchée. Mais, comme la méthode de résistance osmotique était précisément le moyen principal de montrer quantitativement cette tendance à l'hémolyse, nous partons ici à propre-

ment parler de la chose à démontrer. Il nous semble donc préférable de suivre une autre voie, et de provoquer expérimentalement l'hémolyse plus intense et d'étudier ensuite la courbe de résistance. Pour provoquer expérimentalement *in vivo* cette hémolyse intensifiée nous ne faisons pas usage de poisons du sang, connus par la toxicologie, qui agissent suivant un mécanisme très compliqué, mais nous modifions le rapport normal des phosphatides à la cholestérine d'une façon telle que finalement il se produit, comme preuve définitive de l'intensification de l'hémolyse, de l'hémoglobininémie et de l'hémoglobininurie. Nous verrons plus tard de quelle façon cette hémolyse se produit *in vivo*.

Pour provoquer cette hémolyse il est nécessaire que l'animal soumis à l'épreuve suive un régime alimentaire tout à fait exempt de graisse et de lipoides, et qu'on lui administre de la lécithine par la bouche ou par une veine. Voici quelle est l'allure d'une pareille épreuve:

31 oct. Le lapin a été nourri pendant deux jours exclusivement de betteraves et d'un peu d'herbe. Nombre des globules 4.860.000. Sérum incolore. Pas d'urobiline ni d'urobilinogène dans l'urine. La résistance des globules non lavés dans les mélanges de phosphate dilués suivant progression géométrique était:

Concentration de la solution saline	Intensité de l'hémolyse
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	5
$\frac{1}{2}$ "	10
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	90
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	99
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	100

On injecta ensuite 150 mgr. de lécithine (purifiée) en émulsion dans la veine de l'oreille du lapin. Après 15 min. la résistance était.

Concentration de la solution saline	Intensité de l'hémolyse
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	20
$\frac{1}{2}$ "	40
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	95
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	99
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	100

2 heures après l'injection la résistance était

Concentration de la solution saline	Intensité de l'hémolyse
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	10 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	20
$\frac{1}{2}$ "	60
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	95
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	100
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	100 -

1 nov. La résistance était encore celle qui avait été trouvée dans la détermination précédente. On injecta maintenant dans la veine 200 mgr. de lécithine et la résistance fut déterminée au bout de 2 heures. La réaction de l'urobiline dans l'urine, qu'on ne trouve jamais chez le lapin normal, était devenue nettement positive. La résistance était maintenant:

Concentration de la solution saline	Intensité de l'hémolyse
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	20 %
$(\frac{10}{9})^3 \times \frac{1}{2}$ "	50
$\frac{10}{8} \times \frac{1}{2}$ "	95
$\frac{1}{2}$ "	99
$\frac{8}{10} \times \frac{1}{2}$ "	100

Le soir nouvelle injection intraveineuse de 200 mgr. de lécithine.

2 nov. Après injection de 100 mgr. de lécithine la résistance était:

Concentration de la solution saline	Intensité de l'hémolyse
isotonique	5 %
$(\frac{10}{9})^5 \times \frac{1}{2}$ "	40
$(\frac{10}{9})^4 \times \frac{1}{2}$ "	90
$(\frac{10}{9})^3 \times \frac{1}{2}$ "	95
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ "	100

Il y avait donc maintenant une légère hémolyse dans la solution isotonique; aussi l'animal présentait-il nettement de l'hémoglobinémie accompagnée d'une forte hémoglobinurie. Le nombre des globules était tombé à 1.100.000.

En ajoutant un excès d'une constituant physiologique du sang nous avons donc produit une anémie expérimentale, dont le caractère est sans aucun doute primairement hémolytique; l'hémoglobinurie qui s'est déclarée au bout de trois jours en est la meilleure preuve.

Cette tendance à l'hémolyse est-elle démontrée par la courbe de résistance?

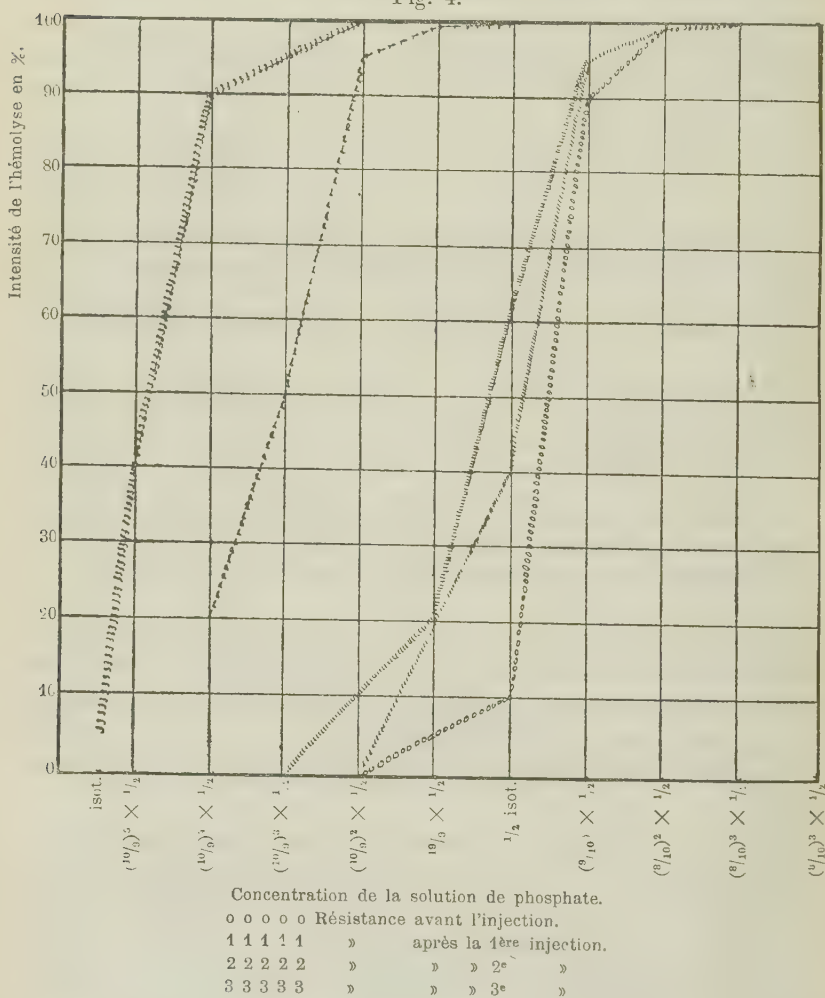
La fig. 4 donne un aperçu des courbes de résistance avant les injections et après la 1^{re}, la 2^e et la 3^e injection. On voit nettement que la fraction la moins résistante commence par diminuer de résistance, après quoi tous les autres globules tendent de plus en plus à s'hémolyser, jusqu'à ce que finalement il se produit une hémolyse en solution isotonique.

Même lorsque la lécithine est introduite par la bouche, ce qui provoque une augmentation beaucoup plus chronique de la démolition des globules, la courbe de résistance peut montrer nettement l'augmentation

de la tendance à l'hémolyse — bien qu'elle soit moins prononcée que tantôt.

L'exemple donné, que nous avons étudié à diverses reprises avec le

Fig. 4.



même résultat, a de la valeur en ce sens que nous sommes partis d'un état dans lequel il existait certainement une augmentation de la tendance à l'hémolyse. Si l'on part de globules de malades atteints d'une affection d'un sang, alors, exception faite pour le sang de malades atteints

d'ictère hémolytique, la tendance à l'hémolyse n'est pas si certaine que l'on pourrait employer ce sang pour la vérification des courbes de résistance.

Par opposition avec ce qui précède nous devons examiner maintenant des globules dont la tendance à l'hémolyse a diminué. Nous ne connaissons, à proprement parler, qu'un seul état de ce genre, notamment dans le sang de l'hypercholestérinémie. De la cholestérine nous savons certainement qu'elle s'oppose à toutes les formes possibles d'actions hémolytiques; cela se manifeste le plus nettement dans l'antagonisme, fortement prononcé, entre cette substance et les phosphatides ¹⁾. Les auteurs antérieurs aussi ont toujours trouvé que dans les cas d'hypercholestérinémie la résistance est augmentée. Mais, comme le rapport entre la cholestérine et les phosphatides est maintenu constant dans l'organisme avec grande ténacité, il n'est pas facile de réaliser, par des expériences d'alimentation des états dans lesquels l'influence plus grande de la cholestérine n'est pas compensée par une augmentation de la concentration des phosphatides. Voilà pourquoi nous avons eu recours à l'injection intraveineuse d'une suspension de cholestérine, afin de produire de cette manière une hypercholestérinémie et d'atteindre par là une diminution dans la destruction du sang.

Une suspension de cholestérine pouvant être injectée dans une veine doit être préparée avec un peu de lécithine servant de „colloïde de protection" (Schutzkolloid). Cette préparation se fait comme suit:

200 mgr. de cholestérine + 50 mgr. de lécithine sont dissous dans un peu d'alcool absolu; la solution est déversée dans 100 cm³. d'une solution saline balancée et l'alcool est chassé à 37° en y faisant passer un courant d'air. Il se forme ainsi une suspension laiteuse permanente de 0,2% de cholestérine dans 0,05% de lécithine.

20 cm.³ de cette émulsion furent injectés dans une veine chez un lapin et la résistance de son sang fut déterminée avant et après l'injection.

Concentration de la solution saline		Hémolyse	
		avant l'injection	20 min. après
	$\frac{1}{2}$ isotonique	5 %	0 %
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$	"	20	0
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$	"	85	10
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$	"	95	80
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$	"	99	95
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$	"	100	98

¹⁾ R. BRINKMAN et M^{lle} E. VAN DAM. *Biochem. Zeitschr.*, 108, 61, 1920.

Ici encore la diminution de la tendance à l'hémolyse est donc démontrée nettement par l'examen de la résistance.

On peut arriver au même résultat par une forte alimentation à la cholestérine.

Une deuxième application physiologique intéressante des courbes de résistance est fournie par l'examen de globules sanguins qui sont restés pendant quelque temps dans les cavités sanguines de la rate. *Cet exemple peut en même temps servir à indiquer une méthode de détermination de l'intensité des influences hémolysantes, dans laquelle on fait usage des courbes de résistance de globules lavés et non lavés.*

Le sang de rate s'obtient comme suit : la rate d'un mouton est extraite du corps le plus rapidement possible et $\frac{1}{2}$ heure après la mort on y fait circuler à partir de l'artère une solution saline balancée. Le liquide coulant de la veine de la rate est recueilli et immédiatement centrifugé. Pour la comparaison on prend aussi des globules de mouton provenant du sang de la carotide, que l'on suspend dans la même quantité de solution saline et que l'on centrifuge également.

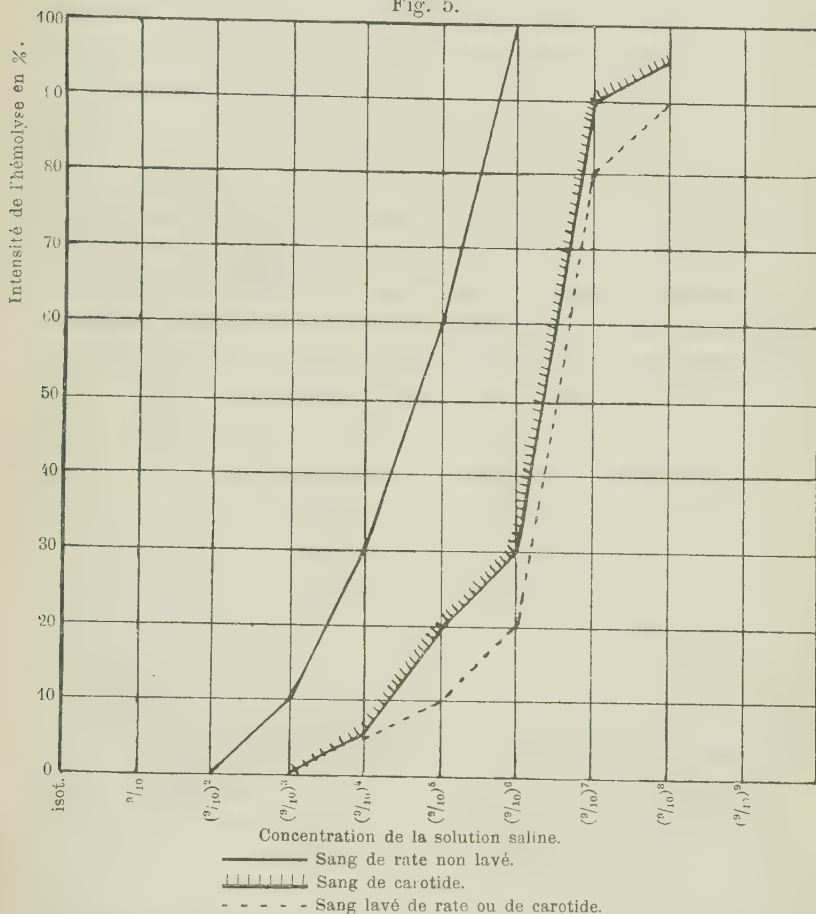
Or, si l'on compare la résistance du sang de rate au sang de carotide, non lavés ou lavés deux fois, on obtient de façon constante le résultat suivant :

		Sang de rate		Sang de carotide	
		non lavé	lavé	non lavé	lavé
$\frac{9}{10}$	isotonique	0%	0%	0%	0%
$(\frac{9}{10})^2$	"	0	0	0	0
$(\frac{9}{10})^3$	"	10	0	0	0
$(\frac{9}{10})^4$	"	30	5	5	5
$(\frac{9}{10})^5$	"	60	10	20	10
$(\frac{9}{10})^6$	"	100	20	30	20
$(\frac{9}{10})^7$	"		80	90	80
$(\frac{9}{10})^8$	"			95	90

On voit par les courbes de résistance représentées dans la fig. 5 combien est nette la différence de tendance à l'hémolyse entre les globules sanguins qui sont restés pendant quelque temps dans la rate et ceux qui proviennent du sang de carotide. Mais, si l'on considère la courbe des cellules sanguines lavées on voit qu'elle est exactement la même pour le sang de rate et pour le sang de carotide. L'augmentation de l'influence hémolysante que les globules subissent dans la rate peut donc être annulée complètement par lavage. Et la distance qui sépare les

courbes de sang de rate lavé et non lavé fait connaître l'intensité de l'action hémolytique de la rate. On peut de même déduire de la distance des courbes de résistance du sang périphérique l'intensité de l'influence hémolysante du plasma.

Fig. 5.



Le troisième facteur important au sujet duquel la détermination de résistance doit nous renseigner est l'intensité de la régénération des globules sanguins rouges. Pour y arriver on fait usage du fait universellement reconnu, établi surtout par les recherches de SNAPPER ¹⁾, que des

¹⁾ SNAPPER, *Biochem. Zeitschr.*, **93**, 256, 1912.

globules jeunes, venant d'être lancés dans le courant sanguin, ont une résistance osmotique relativement élevée. La partie supérieure, plus plate, de la courbe en S typique est donc produite par la fraction des globules jeunes. Comme cette „jeunesse” est une propriété particulière des cellules sanguines elles-mêmes, nous voyons que cette partie régénérative de la courbe est surtout bien prononcée dans la courbe des globules lavés. Ce fait se démontre le mieux chez un lapin qui, après une perte de sang, offre un accroissement rapide du nombre des globules sanguins.

A un jeune lapin, nourri d'avoine, on soustrait 40 cm.³ de sang à l'artère centrale de l'oreille. Avant l'hémorragie le volume des globules était de 0,03 cm.³, dans 0,08 cm.³. de sang, c. à d. 38 %; après l'hémorragie le volume des globules était descendu à 25 % du sang total; 1 jour après le volume était de 28 %, 2 jours après 33 %, 3 jours après la soustraction de sang il y avait une régénération nette. Or, si nous comparons les courbes de résistance d'avant l'hémorragie et de trois jours après, nous obtenons l'image suivante:

Détermination de résistance avant l'hémorragie:

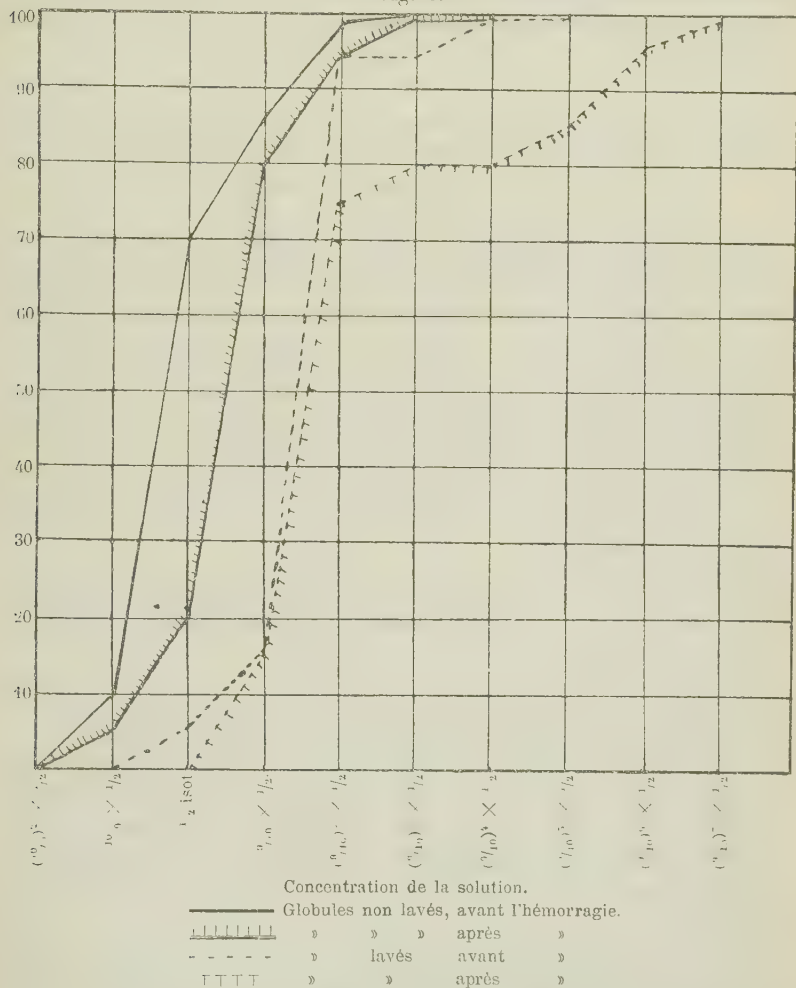
Concentration de la solution	Hémolyse	
	globules non lavés	globules lavés
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	10	0
$\frac{1}{2}$ "	70	5
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	85	15
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	98	95
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	100	95
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	100	98
$(\frac{9}{10})^5 \times \frac{1}{2}$ "	100	99

Détermination de résistance trois jours après l'hémorragie:

Concentration de la solution	Hémolyse	
	globules non lavés	globules lavés
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	5	0
$\frac{1}{2}$ "	20	0
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	80	15
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	95	75
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	98	80
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	99	80
$(\frac{9}{10})^5 \times \frac{1}{2}$ "	100	85
$(\frac{9}{10})^6 \times \frac{1}{2}$ "	100	95
$(\frac{9}{10})^7 \times \frac{1}{2}$ "	100	98

Les courbes de la fig. 6 montrent que la fraction des globules jeunes avant l'hémorragie n'est pas fortement indiquée dans le cas des globules lavés, mais qu'elle est nettement délimitée pour les mêmes globules, lorsqu'ils ont été lavés.

Fig. 6.



On voit qu'après l'hémorragie, lorsque le nombre relatif de globules jeunes était considérablement augmenté, cette fraction est aussi plus fortement accentuée dans la courbe des globules non lavés, mais ce n'est que pour les cellules lavées que l'intensité de la régénération se mani-

ferme pleinement. En effet, nous voyons ici que 20 % des cellules ont le maximum de résistance, une quantité qui correspond à l'accroissement rapide du nombre des globules sanguins.

Un autre exemple de régénération très intense, dont on observe également le retentissement sur les courbes de résistance, est fourni par des expériences sur une alimentation exclusive à la lécithine, déjà publiées.¹⁾

IV. LA SIGNIFICATION DES LIPOÏDES DU SANG POUR LA RÉSISTANCE OSMOTIQUE DES GLOBULES SANGUINS.

Les recherches décrites dans le chapitre précédent ont appris que le lavage des globules sanguins dans une solution saline balancée, ou encore dans une solution de sulfate ou de phosphate, relève la résistance osmotique de ces globules. J'ai examiné maintenant quelle est la cause de cette augmentation de résistance et j'ai trouvé qu'elle réside dans le lessivage d'une substance à action hémolytique, tapissant la surface des globules. Le résultat de cet examen est, en résumé, le suivant :²⁾

1. *Lorsqu'on reporte dans leur sérum, pendant $\frac{1}{2}$ heure, les globules de lapin lavés et devenus par là plus résistants, ces globules reviennent à leur résistance primitive.*

2. *L'action par laquelle le sérum de lapin abaisse la résistance des globules est produite par des substances qui se laissent extraire à l'alcool et à l'éther éthylique.*

3. *Le liquide provenant du lavage des globules du sang de lapin contient des substances qui abaissent la résistance et sont solubles dans l'alcool.*

4. *Le liquide de lavage des globules du sang de lapin contient des phosphatides et un peu de cholestérine. Les phosphatides des globules sanguins et aussi la lécithine du commerce purifiée abaissent la résistance des globules sanguins en solution isotonique. Par addition de faibles concentrations de cholestérine cette action diminuant la résistance est complètement annulée.*

Ces résultats s'appliquent aussi aux globules de sang humain, avec cette différence qu'ici les phosphatides sont presque exclusivement liés aux

¹⁾ R. BRINKMAN et Mlle E. VAN DAM, *Biochem. Zeitschr.*, **108**, 61, 1920.

²⁾ R. BRINKMAN et Mlle E. VAN DAM, *Studien zur Biochemie der Phosphatiden und Sterine*, I et III, *Biochem. Zeitschr.*, **108**, 35, 1920.

globules et n'existent presque plus sous forme active dans le plasma.

C'est donc un fait facile à constater que les globules rouges contiennent des substances qui abaissent leur résistance osmotique. Pouvons-nous dire que ces substances sont pour quelque chose dans la tendance naturelle à l'hémolyse que les cellules du sang manifestent aussi in vivo? Nous savons qu'un globule rouge disparaît de la circulation au bout d'un certain temps, à la suite d'une processus hémolytique; or, devons-nous voir dans les phosphatides mentionnées ci-dessus une cause de l'hémolyse physiologique? Il en certainement ainsi, à mon avis. En effet, nous voyons en général dans les courbes de résistance osmotique une indication de la tendance à l'hémolyse in vivo.

Nous avons indiqué dans le chapitre précédent des cas où nous savions d'avance avec certitude qu'il existait une augmentation de tendance à l'hémolyse; la courbe de résistance y reflétait aussi très bien cet état.

Même lorsqu'on cherche la cause de l'hémolyse naturelle dans un sens sérologique (autolysines) on constate que la courbe de résistance peut indiquer la commencement de l'action de l'hémolysine, puisque Fr. OTTIKER ¹⁾ trouva que l'abaissement de la résistance osmotique est le réactif le plus subtil pour une action des hémolysines. Du fait que le lavage des globules sanguins a pour conséquence une augmentation de résistance et que l'agent abaissant la résistance doit être cherché dans le liquide de lavage et est une phosphatide, nous devons donc conclure provisoirement que *les phosphatides normales du sang ont une lente action hémolysante sur les globules rouges du sang.*

Pour démontrer ce fait, important à mon avis, j'ai extrait séparément les phosphatides des globules normaux et je les ai fait agir ensuite sur des globules normaux, suspendus dans une solution saline balancée. Il se produisit toujours une hémolyse intense, ce qui confirme la conclusion provisoire ci dessus.

Mais, pour démontrer ce fait, il fallait avoir une idée de la classification chimique des lipoides du sang et comparer entre elles les diverses fractions du point de vue de leur activité biologique.

La biochimie des lipoides du sang (il faut entendre par là toutes les substances que l'on peut extraire du sang par les solvants des graisses) a fait, dans ces dernières années, l'objet de plusieurs études, parce qu'on

¹⁾ OTTIKER, Thèse, Zurich, 1914.

disposait, à côté des anciennes méthodes de KOMAGUWA-SUTO et d'autres, de deux méthodes d'extraction analytiques, savoir la méthode de BLOOR¹⁾ et la microméthode de I. BANG²⁾. Cette dernière méthode permet de confirmer que les lipoides du sang peuvent être classés en quatre groupes, savoir:

1. Les graisses du sang;
2. La cholestérine libre;
3. Les éthers de la cholestérine;
4. Les phosphatides.

Les concentrations normales de ces substances dans le sang humain sont, en moyenne, les suivantes:

cholestérine + éthers de la cholestérine; pour des hommes normaux 0,15 à 0,18 %; pour des femmes normales ces nombres sont un peu plus élevés;

les phosphatides existent normalement dans le sang en concentration de 0,3 %, peut être un peu moins dans le sang de femme;

la concentration des graisses neutres ne peut pas facilement être indiquée séparément, parce que leur quantité est généralement donnée comme concentration totale des acides gras, ce qui comprend aussi l'acide du phosphatide.

Ces concentrations ne sont pas des grandeurs constantes, car elles dépendent de l'alimentation ou d'autres conditions physiologiques et pathologiques.

Bien plus important que la concentration absolue sont, toutefois, les rapports des diverses fractions, car dans ces rapports nous avons réellement affaire à des constantes physiologiques.

Si nous prenons comme exemple le rapport des concentrations de cholestérine et de phosphatide, nous pouvons considérer ce rapport aux points de vue fonctionnel, ou chimique ou physico-chimique. Il est remarquable que ces substances, qui chimiquement n'ont pour ainsi dire rien de commun, s'accompagnent mutuellement d'une manière si constante, qu'on les a réunies antrefois sous le nom de „lipoides”.

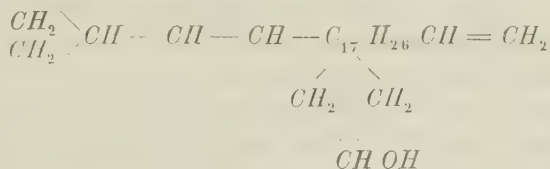
Les phosphatides doivent être considérés en général comme des

¹⁾ BLOOR, *Journ. Biol. Chem.*, **17**, 377, 1914; **19**, 1, 1915; **22**, 133 et 145, 1916; **24**, 227 et 447, 1917; **25**, 577, 1918.

²⁾ I. BANG, *Biochem. Zeitschr.*, **91**, 86 et 235, 1919.

dérivés de l'acide orthophosphorique, éthérisé d'une part par un radical alcoolique de la glycérine (les deux autres groupements alcooliques étant remplacés par des radicaux d'acides gras), uni d'autre part au groupement alcoolique de la choline (hydroxyde de triméthoxyéthylammonium). Les phosphatides contiennent donc aussi bien *N* que *P*; par la variation des nombres d'atomes *N* et *P*, et aussi par l'existence de plusieurs radicaux d'acides gras, on peut distinguer diverses phosphatides, qui sont surtout bien connues au point de vue chimique depuis les recherches fondamentales de LEVENE ¹⁾; toutefois, nous ne savons pas exactement quelle est la structure du phosphatide du sang; on parlait autrefois de lécithine, mais il n'est pas impossible qu'il soit préférable de rapporter une partie à la forme de la céphaline!

Les stérines se présentent dans le monde végétal sous diverses formes; dans la biologie animale on n'en connaît qu'un seul représentant, la cholestérine. Les recherches de WINDAUS ²⁾ nous ont appris quelque chose au sujet de sa formule de structure, qui serait :



La cholestérine offre donc une double soudure et un groupement alcoolique secondaire, ce qui permet la formation d'une combinaison éthérée avec des acides. Les 17 atomes de carbone du centre forment un système annulaire compliqué, ainsi qu'on le rencontre dans les terpènes végétaux.

Le radical de la cholestérine n'a aucun rapport avec les autres groupements chimiques contenus dans le corps; seul l'acide cholique des cholates a une structure analogue.

Au point de vue physico-chimique il y a une opposition prononcée entre les deux groupes. Les phosphatides sont toutes des colloïdes fortement hydrophiles, qui forment donc très facilement dans l'eau une émulsion stable; à ce point de vue ils sont tout à fait comparables aux matiè-

¹⁾ P. A. LEVENE, Structure and Significance of the Phosphatids, *Physiol. Rev.*, I, n°. 3, 1921.

²⁾ WINDAUS, *Biochem. Handlexicon*, III, p. 268, 1911.

res albuminoïdes. Ils possèdent en outre, à un haut degré, la propriété d'abaisser la tension superficielle de l'eau: ils ont, comme l'exprime J. TRAUBE, une forte réaction capillaire. La combinaison de l'augmentation de viscosité et de la réactivité capillaire donne lieu à une forte spumosité de la solution de phosphatide. Ils conviennent particulièrement bien comme colloïdes de protection. c'est à dire pour faire entrer en solution colloïdale des substances qui par elles-mêmes ne sont pas dispersives.

Les stérines, par contre, dont la cholestérine est le seul représentant que l'on trouve chez les mammifères, ont un caractère hydrophobe très prononcé. Une solution colloïdale de ces substances dans l'eau n'est possible qu'au moyen d'un „colloïde de protection” et l'abaissement de la tension superficielle est quasi nul; aussi contrarient-elles la „détente superficielle” produite par la lécithine (voir fig. 7).

Au point de vue diélectrique aussi il y a une opposition frappante. Les phosphatides sont d'assez bons conducteurs de l'électricité et leur constante diélectrique est particulièrement élevée, savoir 98 ¹⁾ (celle de l'eau est 81); la cholestérine est un isolant, avec une constante diélectrique 5,4 ¹⁾. J'ai déjà fait observer dans une communication précédente quelle est la signification de cet antagonisme.

Au point de vue fonctionnel-biologique aussi il y a un antagonisme prononcé. C'est surtout dans l'hémolyse sérologique qu'on connaît de nombreux cas où le phosphatide favorise l'hémolyse, tandis que la cholestérine annule de nouveau l'effet du phosphatide ²⁾. La résistance des globules sanguins à l'influence hémolysante des saponines est augmentée par la cholestérine et abaissée par la lécithine ³⁾; ce phénomène s'observe aussi pour les membranes de PASCUCCI, bien connues, de mélanges de cholestérine et de lécithine ⁴⁾.

Ainsi que je l'ai décrit déjà à la page 38 j'ai trouvé une diminution nette de la résistance en employant des quantités physiologiques de lécithine; cette diminution est annulée par de faibles concentrations de cholestérine. J'ai vu aussi au microscope que les globules sanguins perdent rapidement leur matière colorante dans une émulsion de lécithine à 0,5 % et deviennent ce qu'on appelle des „fantômes”; ce phénomène aussi disparaît lorsqu'on ajoute de la cholestérine.

¹⁾ D'après une communication personnelle de M. R. KELLER.

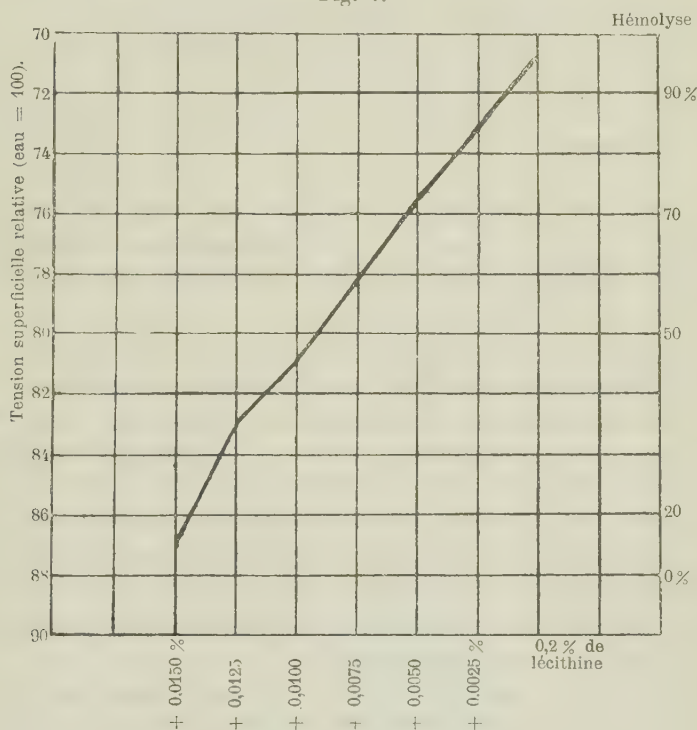
²⁾ LANDSTEINER. *Kolle-Wassermann's Handbuch*, II, p. 1291, 1913.

³⁾ MEYER, *Beitr. chem. Physiol. u. Pathol.*, 11, 357 (1908).

⁴⁾ PASCUCCI, *ibid.*, 8, 552 (1905).

On sait de plus que l'organisme se défend contre des influences hémolytiques par une hypercholestérinémie ¹⁾ et qu'en général cette augmentation de la quantité de cholestérine dans le sang a pour effet une augmentation de la résistance ²⁾.

Fig. 7.



Augmentation de la tension superficielle d'une émulsion de phosphatide à 0,2 % par l'addition de faibles concentrations de cholestérine. Diminution de l'action hémolytique.

Dans la phagocytose l'antagonisme a été observé par STUBER ³⁾ et dans les phénomènes de croissance par ROBERTSON et d'autres ⁴⁾.

Cette courte énumération suffira pour illustrer l'antagonisme physicochimique et biologique des phosphatides et de la cholestérine. Parmi

¹⁾ LAPORTE et ROUZAUD, *Comptes rendus de la Soc. d. Biol.*, 83, 477, 1920
TROISIER et HUBERT, *Journ. d. Physiol. et Pathol. générale*, 16, 483, 1914.

²⁾ Résumé dans BYLINE et KHOSROEFF, *Le médecin russe*, 13, 579, 681 et 722, 1914.

³⁾ STUBER, *Biochem. Zeitschr.*, 51, 211.

⁴⁾ ROBERTSON, *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 10, 59.

ces corps c'est le phosphatide qui est la substance active; la cholestérine n'est active qu'en ce sens qu'elle annule l'influence du phosphatide; elle joue un rôle passif, qui n'en est pas moins important. Comme l'activité capillaire des phosphatides est une des propriétés principales que nous puissions invoquer pour expliquer leur action biologique, il est intéressant d'examiner quelle est l'influence d'une addition de cholestérine sur la tension superficielle d'une solution de lécithine. La courbe de la fig. 7 en donne un aperçu. On voit que la détente superficielle produite par la lécithine est empêchée jusqu'à un certain point par la cholestérine.

On comprend maintenant que le rapport constant entre les fractions de phosphatide et de cholestérine, telle qu'il est maintenu dans les cas normaux, malgré les variations assez considérable des concentrations absolues, garantit une fonction biologique constante. Les recherches de TERROINE ¹⁾, de BLOOR ²⁾, de WACKER et HUECK ³⁾, ont prouvé avec certitude que l'organisme des mammifères sait conserver avec ténacité son rapport cholestérine: lécithine dans les cas d'alimentation unilatérale intense et dans l'état affamé; cette constance existe aussi pour les constituants de la cellule, de sorte que A. MAYER et SCHAEFFER parlent d'une „constante lipocytaire” ⁴⁾, dont dépend, selon ces auteurs, la teneur en eau des cellules. Dans le cas spécial de l'hémolyse nous devons donc nous représenter les choses ainsi, que la phosphatide, fortement hémolytique par elle-même, est rendue inactive par la cholestérine au point que son influence ne peut plus être démontrée que par une diminution de la résistance osmotique.

Si nous voulons donc mesurer quantitativement l'action hémolytique exercée par une couche de phosphatide adsorbée par le globule sanguin, nous devons séparer la phosphatide de la cholestérine inhibitrice. Cette séparation nous permet d'établir

1°. quelle est l'intensité de l'action hémolytique du phosphatide dans un sang donné;

2°. quelle est l'intensité de l'inhibition par la cholestérine.

On pourrait faire cette détermination en effectuant des dosages quantitatifs de la cholestérine et du phosphatide dans le sang, mais cette

¹⁾ TERROINE, Contributions à l'étude des substances.

²⁾ BLOOR, *Journ. Biol. Chem.*, **25**, 577, 1916.

³⁾ WACKER et HUECK, *Biochem. Zeitschr.*, **100**, 84, 1919.

⁴⁾ MAYER et SCHAEFFER, *Journ. Physiol. et Pathol. gén.*, **16**, 1 et 23, 1914.

méthode présente cet inconvénient que nous ne disposons pas d'une méthode de dosage des phosphatides utilisable dans les cliniques. J'ai constaté que la microméthode de BANG ¹⁾ (extraction spécifique et titrage à l'acide chromique) était trop peu précise et la méthode néphélométrique est très compliquée en technique ²⁾.

Comme il s'agissait spécialement pour nous d'étudier l'action hémolytique des phosphatides et pas tant de déterminer leur concentration, nous avons seulement déterminé l'effet lytique en diluant à $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ etc. le phosphatide du sang, dissous dans autant de cm³. de solution saline balancée qu'il y avait primitivement de cm³. de sang et en examinant chaque fois l'action hémolytique.

L'extraction fractionnée des lipoides suivant le système de BANG repose sur les principes suivants:

1°. On extrait au moyen d'éther de pétrole bouillant la graisse et la cholestérine contenues dans du papier buvard trempé de sang et bien séché;

2°. Des papiers traités à l'éther de pétrole on extrait le phosphatide et les éthers de cholestérine au moyen d'alcool, pendant 24 heures à la température ordinaire.

Nous sommes donc bien capables de séparer la cholestérine des phosphatides par une simple extraction, mais les éthers de cet alcool secondaire sont encore contenus dans l'extrait de phosphatide.

Comme il s'agit en premier lieu des lipoides adsorbées aux globules sanguins, nous pouvons faire usage du fait, établi par FALTA et RICHTER-QUITTNER ³⁾, que la quantité totale de cholestérine est distribuée entre le plasma et les globules sanguins de telle façon que les cellules contiennent uniquement de la cholestérine et le plasma uniquement des éthers de cet alcool.

Une extraction isolée des phosphatides doit donc réussir certainement, si nous n'extrayons pas le sang total, *mais seulement les globules sanguins*. La première extraction, à l'éther de pétrole, dissout alors la cholestérine et la deuxième, à l'alcool, la phosphatide.

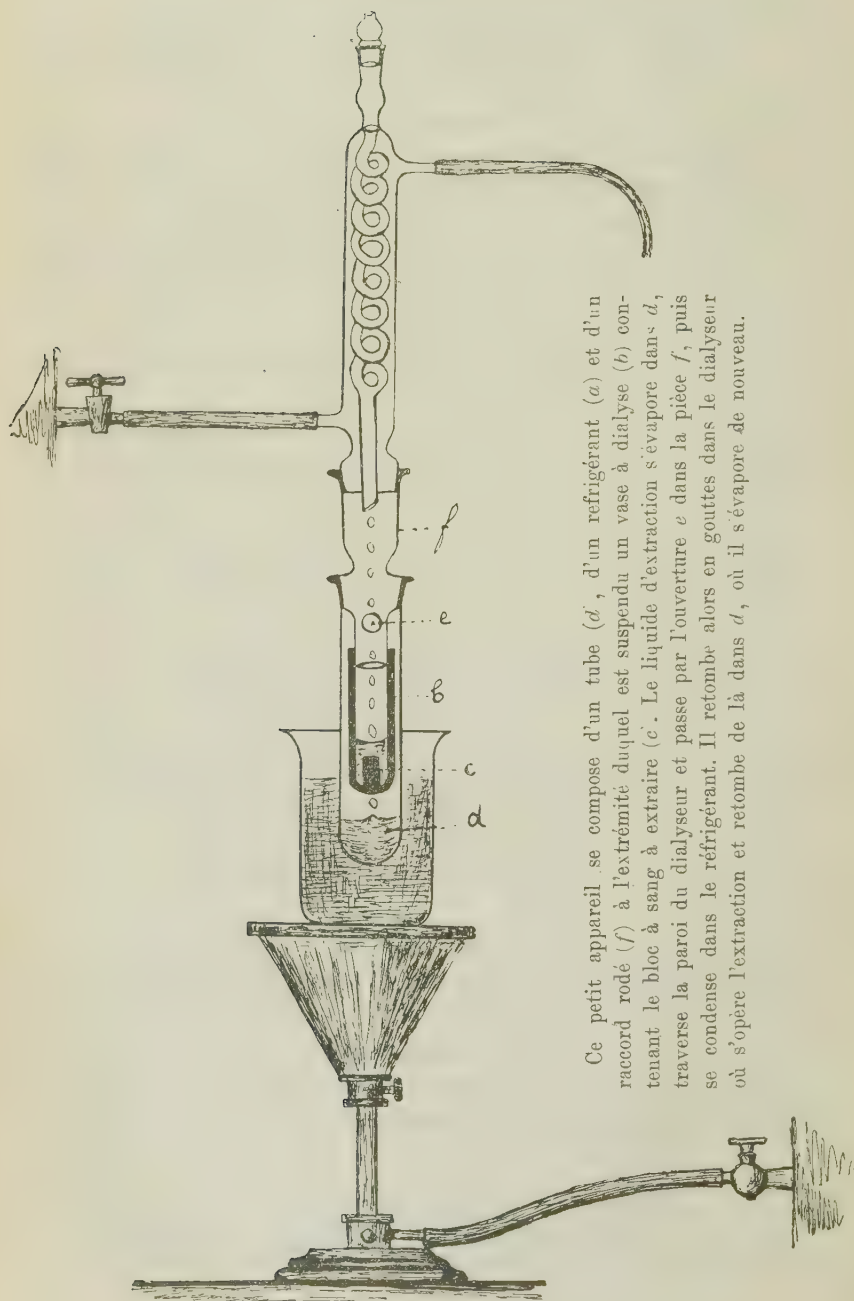
Pour raccourcir la durée de l'analyse nous avons remplacé l'extraction à l'alcool, de 24 heures, par un traitement au chloroforme de $\frac{1}{2}$ heure;

¹⁾ I. BANG, *Biochem. Zeitschr.*, loc. cit.

²⁾ BLOOR, *Journ. Biol. Chem.*, **22**, 133; **31**, 575; **36**, 33 et 48.

³⁾ FALTA et RICHTER-QUITTNER, *Wiën. Arch. f. klin. Med.*, I, 425, 1920.

Fig. 8.



Ce petit appareil se compose d'un tube (*d*), d'un réfrigérant (*a*) et d'un raccord rodé (*f*) à l'extrémité duquel est suspendu un vase à dialyse (*b*) contenant le bloc à sang à extraire (*c*). Le liquide d'extraction s'évapore dans *d*, traverse la paroi du dialyseur et passe par l'ouverture *e* dans la pièce *f*, puis se condense dans le réfrigérant. Il retombe alors en gouttes dans le dialyseur où s'opère l'extraction et retombe de là dans *d*, où il s'évapore de nouveau.

les résultats restent les mêmes et 2 heures suffisent pour une détermination complète des phosphatides hémolytiques.

L'exécution technique de la détermination se fait comme suit:

On prend une quantité de sang exactement mesurée (3 cm^3) (sang défibriné ou traité à l'oxalate), dont le volume relatif des globules a été déterminé par la méthode de l'hématocrite; on la centrifuge vivement pendant $\frac{3}{4}$ d'heure et puis on enlève tout le plasma. Les globules restants sont alors absorbés, à l'aide d'un peu de solution isotonique, dans de petits blocs de papier buvard (Absorptionsblöckchen de SCHLEICHER et SCHÜLL) et séchés dans un courant d'air chaud (ce qu'on appelle un „Föhn"). Les blocs de sang séchés sont extraits ensuite dans un petit appareil pour extraction continue, dont la fig. 8 donne une représentation. *Cet appareil permet d'effectuer en une heure l'extraction de la cholestérine et des phosphatides.*

Pour pouvoir faire agir la phosphatide isolée sur les globules sanguins, on évapore à siccité l'extrait chloroformique et on délaie le résidu dans une solution saline balancée. Pour obtenir une émulsion homogène il est nécessaire de triturer la masse de phosphatide pendant quelque temps, avec précaution, avec une solution saline chaude, *en évitant autant que possible la formation d'écume.*

J'ai essayé, au début, d'obtenir une émulsion en agitant la phosphatide privée de chloroforme avec la solution saline dans un tube en verre à bouchon rodé: ce tube tournait dans un thermostat à 37° . Mais j'ai constaté que l'émulsion fortement spumeuse que l'on obtient ainsi n'avait qu'une faible activité hémolytique. Une émulsion de même concentration, obtenue par une trituration prudente dans la solution saline, avait une action beaucoup plus énergique.

Ce phénomène est analogue est à celui qu'en sérologie on connaît sous le nom de „Schüttelinaktivierung" et est un effet de la formation d'écume. Il peut notamment se produire un changement irréversible des colloïdes actifs, par lequel le phénomène spécifique est affaibli ou même empêché complètement.

Lorsque nous avons obtenu l'émulsion par trituration du résidu du séchage, nous avons donc isolé dans 3 cm^3 . de solution saline balancée les phosphatides des globules de 3 cm^3 . de sang. De cette solution on fit de la manière suivante une série de dilutions en progression géométrique.

On prend huit petits tubes à essais de même grandeur; dans le premier on met 3 cm^3 . d'émulsion de phosphatide et dans les 7 autres $1\frac{1}{2}\text{ cm}^3$. de solution saline isotonique balancée (p. ex. le mélange de

phosphates décrit précédemment). Au moyen d'une pipette appropriée on prélève $1\frac{1}{2}$ cm.³ du premier tube et on les verse dans le 2^d; on mélange bien et l'on prend $1\frac{1}{2}$ cm.³ de ce mélange pour les porter dans le troisième. En continuant de la sorte on obtient donc la série de dilutions $\frac{1}{1}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ etc. Dans chaque tube on introduit alors 10 mm.³ ($\frac{1}{2}$ pipette de l'hémoglobinomètre de SAULI) du même sang dont on a fait l'extraction. La suspension est bien mélangée et on la met pendant $\frac{1}{2}$ heure à l'étuve à 37°. On centrifuge ensuite et on détermine l'intensité de l'hémolyse.

On obtient de cette façon la résultat suivant pour du sang humain.

3 cm.³ de sang défibriné (pris au bout d'un doigt) sont centrifugés pendant $\frac{3}{4}$ heure; extraction des globules absorbés par un bloc de papier pendant $\frac{1}{2}$ heure à l'éther de pétrole, puis pendant $\frac{1}{2}$ heure au chloroforme; résidu de la dessiccation délayé dans 3 cm.³ d'une solution balancée (NaCl 0,7 %; NaHCO_3 0,2 %; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{aq.}$ 0,02 %; KCl 0,02 %; $[\text{H}] = 0,45 \cdot 10^{-7}$). Puis préparation d'une série de dilutions en progression géométrique de l'émulsion de phosphatide; pour chaque 1,5 cm.³ d'émulsion 10 mm.³ de sang frais. Chauffage à 37° en tube fermé pendant $\frac{1}{2}$ heure.

Résultat: émulsion non. diluée: hémolyse complète

„	diluée à $\frac{1}{2}$:	„	60 %
„	„ $\frac{1}{4}$:	„	10 „
„	„ $\frac{1}{8}$:	„	pas d'hémolyse

Il est clair que de cette façon on réussit simplement à montrer que chaque globule contient une quantité de phosphatide suffisante pour l'hémolyser en peu de temps, s'il n'y avait pas cholestérine pour tempérer l'activité du phosphatide.

Je dois encore mentionner à ce propos que déjà avant nous FRIEBOES¹⁾ avait montré qu'il est possible d'extraire des globules sanguins, au moyen de chloroforme, une substance à activité hémolytique. Cette substance est décrite comme suit: il est difficile de rendre cette substance inactive à l'aide d'acide ou de lessive alcaline étendus, elle résiste à l'ébullition et perd son activité hémolytique par la cholestérine. Elle donne beaucoup d'écume, est colloïde et émulsionne la graisse; elle est précipitée par des acides, est redissoute par les alcalis, est précipitable par l'acétate de plomb, etc.; bref, elle offre les nombreuses réactions des phosphatides et est probablement identique à la substance trouvée par nous. FRIEBOES appelle cette substance le *saponoïde* du sérum sanguin et montra

¹⁾ FRIEBOES, *Deutsch. med. Wochenschr.*, 40, 598, 1914.

sa présence dans le sérum humain et dans celui de divers animaux. Il ne fit pas, à notre connaissance, d'autres communications sur ce sujet; du moins, nous n'avons pas trouvé une suite à ces recherches.

Si l'on ajoute l'extrait de cholestérine à l'extrait de phosphatide et qu'on en fasse ensuite une émulsion dans une solution physiologique on obtient un liquide dans lequel l'action hémolytique du phosphatide est annulée, et où on ne peut plus montrer que la diminution de résistance décrite précédemment.

La signification de cet extrait de cholestérine pour le pouvoir d'agglutination normal et pour la vitesse de dépôt ainsi que pour l'isolement électrique normal des globules et pour leur forme a été exposée dans des communications antérieures ¹⁾.

Il nous semble intéressant d'examiner si la détermination du phosphatide hémolytique, qui vient d'être décrite, se prête bien à l'examen de la tendance physiologique ou pathologique à l'hémolyse. Si elle convient à cette recherche, on dispose par cette méthode d'un moyen pour déterminer dans de nombreux états hémolytiques la force et peut être la nature du poison hémolytique. Dans les cas normaux l'action du phosphatide sur les globules sanguins d'un même individu est assez bien constante, comme le prouve le tableau de la page suivante.

On voit que normalement l'action du phosphatide est assez variable, bien que la résistance osmotique reste fort constante. Cela s'accorde avec les fluctuations de la concentration totale en phosphatides, trouvées par voie chimique par Bloor; si la résistance osmotique ne change pas, c'est parce que la concentration de la cholestérine suit les variations de celle des phosphatides, de sorte que le quotient reste le même.

Si nous comparons l'intensité de l'action de la phosphatide dans le sang normal d'homme et de lapin nous constatons qu'il y a nettement un parallélisme entre les résultats de la détermination de résistance et l'analyse de phosphatide de globules hémolytiques active.

La résistance osmotique des globules de lapins nourris d'herbe, de betteraves et d'avoine est toujours plus basse que celle des globules de sang humain. C'est ainsi qu'en comparant deux exemples typiques de sang non lavé je trouve:

¹⁾ R. BRINKMAN et M^{lle} H. WASTL, *Biochem. Zeitschr.*, **124**, 25, 1921.

R. BRINKMAN et M^{lle} E. VAN DAM, *Biochem. Zeitschr.*, loc. cit.

TABLEAU.

		Hémolyse.
R. B., 26 sept., 1100 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	complète
	avec 10 mm ³ . de sang.	$\frac{1}{2}$ 80 %
		$\frac{1}{4}$ 5 %
		0
R. B., 29 sept., 1090 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ 90 %
	avec 10 mm ³ . de sang.	$\frac{1}{2}$ 10 %
		$\frac{1}{4}$ 0
R. B., 30 sept., 980 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ 40 %
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 0
R. B., 1 oct., 1070 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ 90 %
	avec 10 mm ³ . de sang.	$\frac{1}{2}$ 20 %
		$\frac{1}{4}$ 0
R. B., 2 oct., 950 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 60 %
		$\frac{1}{4}$ 5 %
		0
P. C. W., 950 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 20 %
		$\frac{1}{4}$ 0
N. B., 940 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 60 %
		$\frac{1}{4}$ 5 %
		0
P. H., 960 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 30 %
		$\frac{1}{4}$ 0
J. S. R., 1000 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ 90 %
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 10 %
		$\frac{1}{4}$ 0
R. N., 1040 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ 90 %
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 5 %
		$\frac{1}{4}$ 0
J. J. B., 980 mgr. d'extrait de globules dans 3 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37°	$\frac{1}{2}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 30 %
		$\frac{1}{4}$ 5 %
		$\frac{1}{4}$ 0

Conc. de la sol. de phosph.	Hémol. sang humain	Hémol. sang de lapin
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	0	10
$\frac{1}{2}$ "	0	70
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	15	80
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	90	98
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	98	100
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	100	

La teneur en cholestérine du sang humain était 0,13 %, celle du sang de lapin 0,12 %; ces valeurs sont donc pratiquement les mêmes. Or, comme la résistance moindre du sang de lapin est causée par une concentration plus élevée (une activité hémolytique plus forte) du phosphatide, il devait être possible de le démontrer par l'analyse d'écrite ci-dessus. Le résultat fut le suivant :

		Hémolyse
600 mgr. d'extrait de globules de sang humain dans 2 cm ³ . de sol. sal.	$\frac{1}{2}$ h. à 37°.....	$\frac{1}{1}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ 20 %
		$\frac{1}{4}$ 0
600 mgr. d'extrait de globules de sang de lapin dans 2 cm ³ . de sol. sal.....	$\frac{1}{2}$ h. à 37°.....	$\frac{1}{1}$ complète
	avec 10 mm ³ . de sang	$\frac{1}{2}$ "
		$\frac{1}{4}$ "
		$\frac{1}{8}$ 20 %
		$\frac{1}{16}$ 0

La différence entre l'action des phosphatides sur les globules sanguins de l'homme et sur ceux du lapin est donc très nettement illustrée par l'exemple ci-dessus. J'ai souvent étudié cette différence et toujours avec le même résultat; *nous voyons ainsi comment l'analyse des phosphatides permet de rechercher la cause directe de la diminution de résistance.*

Un pendant à cette analyse de la diminution de résistance est donné par l'examen d'une augmentation de résistance. J'ai trouvé p. ex. une augmentation de résistance bien nette chez un malade souffrant d'un cancer de l'estomac; c'est ce que montre le tableau suivant :

Concentration de la solution saline	Hémolyse
	globules lavés globules non lavés
$\frac{1}{2}$ isotonique	0 % 0 %
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	0 0
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	0 5
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	10 20
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	85 75
$(\frac{9}{10})^5 \times \frac{1}{2}$ "	100 95

En comparant cette détermination de résistance avec celle de sang normal on constate que la résistance des globules non lavés se rapproche de celle des globules non lavés, d'où l'on devrait donc conclure qu'il n'y a ici qu'une faible quantité de phosphatide hémolytique ou qu'une haute teneur en cholestérine annule l'action du phosphatide. L'analyse des lipoides apprend que l'un et l'autre sont le cas.

1020 gr. d'extrait de globules dans	1 h. à 37°	pas d'hémolyse
3 cm ³ . de sol. saline	avec 10 mm ³ . de sang	

La teneur en cholestérine des globules sanguins était de 0,35 % ¹⁾; elle était donc fortement augmentée, tandis qu'après 1 heure d'action à 37° il ne se manifestait aucune action du phosphatide. Après un séjour de 4 heures à 37° l'hémolyse était de 50 %; il y avait donc bien un peu de phosphatide.

La preuve qu'à côté de la faible action des phosphatides une haute teneur en cholestérine est la cause de l'augmentation de résistance est fournie lorsqu'on fait agir de l'extrait de phosphatide sur des globules lavés et non-lavés; l'hémolyse est alors

	globules lavés	globules non-lavés
après 4 heures	50 %	0 %
" 8 "	complète	0

Dans le cas des globules lavés la cholestérine de la surface des globules et celle du plasma a été enlevée.

Je me rends parfaitement compte que les quelques exemples donnés ici ne suffisent pas pour établir l'utilité pratique de cette analyse biologique des lipoides pour l'hématologie; je ne fais qu'exposer ici comment je me figure qu'on pourrait faire un examen systématique dans les maladies du sang et j'espère avoir l'occasion, plus tard, d'en faire l'application.

V. ANÉMIE EXPÉRIMENTALE PAR PERTURBATION DE L'ÉQUILIBRE PHOSPHATIDE-CHOLESTÉRINE.

Après avoir pris connaissance, par les recherches décrites ci-dessus, de la grande importance du rapport des quantités de phosphatide et de cholestérine pour la tendance à l'hémolyse, j'ai cherché à connaître l'in-

¹⁾ Méthode AUTENRIETH-FUNK.

fluence d'une perturbation intentionnelle de cet équilibre sur la formation et la destruction des globules, afin de démontrer de cette manière l'importance de la fraction lipoidique pour l'hématologie.

Ainsi que je l'ai déjà décrit plus haut, le rapport cholestérine : lécitine reste opiniâtrement constant, même dans des conditions nutritives modifiées, et il n'est pas aisé de modifier ce rapport. Un moyen nous est cependant donné par le fait important que l'organisme de mammifère dépend en grande partie de son alimentation pour ce qui regarde sa provision de cholestérine. La possibilité d'une synthèse de cholestérine, prouvée pour les oiseaux, ne l'est pas pour les mammifères.

C'est un fait bien connu que dans le réglage de la concentration de la cholestérine dans le sang l'écorce des surrénales, et peut-être aussi le corps jaune et la rate, jouent un grand rôle, mais ces organes aussi contiennent de la cholestérine d'origine principalement exogène. *En tous cas, j'ai reconnu que dans le cas d'une alimentation sans cholestérine une synthèse rapide de grandes quantités de cholestérine ne peut pas avoir lieu chez le lapin.*

Mais dans le cas où la nourriture contenait une quantité suffisante de cholestérine (avoine comme surcroît d'aliment), il était tout à fait impossible de rompre dans une mesure importante l'équilibre des lipoides en augmentant l'apport de phosphatides (par la bouche ou par les veines), parce que la teneur en cholestérine augmente alors parallèlement à la concentration des phosphatides. On y arrive bien lorsqu'on combine l'administration de phosphatides à une alimentation pauvre en cholestérine, en donnant p. ex. à l'animal des betteraves et de l'herbe, ainsi que cela est décrit dans le rapport suivant :

Un lapin est nourri pendant deux jours exclusivement de betteraves ; l'image du sang rouge est alors (14 nov.):

Nombre des globules rouges 5.200.000.

Hémoglobine (SAHLI) 65 %.

Préparation sans anisocytose ; polychromatophilie 5 %.

Pas d'urobiline ni d'urobilinogène dans l'urine.

La résistance était :

Concentration de la solution	Hémolyse	
	Globules lavés 2 fois	Globules non lavés
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	0	10
$\frac{1}{2}$ "	0	70
$\frac{2}{10} \times \frac{1}{2}$ "	10	95
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	70	98
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	95	100

Analyse des lipoides:

600 mgr. extrait chloroformique de globules sanguins dans 2 cm ³ . sol. sal.	1 h. à 37° avec 10 mm ³ . de sang	Hémolyse
		$\frac{1}{1}$ complète
		$\frac{1}{2}$ " "
		$\frac{1}{4}$ 80 %
		$\frac{1}{8}$ 20

Teneur totale en cholestérine 0,13 %.

On injecte maintenant au lapin, par une veine, 200 mgr. de lécithine, en émulsion dans une solution saline. L'animal supporte ces injections sans présenter aucune réaction.

L'émulsion de lécithine est préparée comme suit: 1 gr. de lécithine ex ovo (MERCK) est dissous dans de l'éther éthylique; on centrifuge bien la solution et on la déverse ensuite dans de l'acétone pure, où les phosphatides sont insolubles. On recueille le précipité qu'on redissout dans l'éther et on précipite de nouveau par l'acétone. Cette opération est répétée deux fois encore, et finalement le résidu a une couleur jaune clair. Cette phosphatide plus pure est dissoute ensuite dans un peu d'alcool chaud et déversée dans une solution saline; puis l'alcool est chassé par un courant d'air chaud, jusqu'à ce que l'odeur d'alcool ait complètement disparu; alors l'émulsion est prête.

$\frac{1}{2}$ heure après l'injection la résistance était un peu abaissée; 2 heures après elle était redevenue normale. Le soir on injecta encore une fois 200 mgr. et on injecta ainsi pendant 2 jours consécutifs 750 mgr. de phosphatide par jour en 3 portions.

L'image du sang était alors la suivante:

Nombre des globules rouges 3.500.000. Hémoglobine 60 %. Préparation: forte anisocytose, 20 % des globules sont 2 à 3 fois plus grands que normalement et de forme irrégulière; à côté d'eux on voit aussi de nombreux microcytes. La polychromatophilie est particulièrement prononcée (40 %); il y a quelques normoblastes que normalement on ne trouve jamais et 3 mégalo blastes polychromatophiles.

L'urine donna une réaction intense d'urobiline.

La résistance était:

Concentration de la solution	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^5 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	10 %
$(\frac{10}{9})^4 \times \frac{1}{2}$ "	5	20
$(\frac{10}{9})^3 \times \frac{1}{2}$ "	10	50
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ "	20	75
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	70	85
$\frac{1}{2}$ "	80	95
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	90	98

On continua à injecter au lapin de grandes quantités de phosphatide (1 gr. par jour) et en deux jours la résistance diminua au point que l'hémolyse se produisit en solution isotonique.

Le nombre de globules sanguins était alors tombé à 1.400.000, mais la teneur en hémoglobine était encore 45, de sorte que l'augmentation de l'indice était très forte.

Il y avait un légère hémoglobinémie (que n'explique toutefois pas l'indice élevé) et une assez forte hémoglobinurie. Après une dernière injection de 500 mgr. de lécithine il se produisit une très forte hémoglobinurie et l'expérience fut arrêtée.

Dans cette épreuve, qui sert d'exemple pour beaucoup d'autres, lesquelles donnèrent le même résultat, nous avons donc produit, par une administration intense de phosphatide et une alimentation pauvre en cholestérine, une forte anémie hémolytique, caractérisée par une diminution de résistance, une urobilinurie et finalement une hémoglobinurie.

Les organes hématogènes ne restèrent pas sans réaction, ainsi que le prouvent l'anisocytose particulièrement forte, la polychromatophilie, l'existence de normoblastes, l'indice élevé et l'accroissement de la portion de régénération de la courbe de résistance. Ce dernier fait se reconnaît par la comparaison des deux déterminations de résistance communiquées dans le rapport de cette épreuve.

On obtient une image un peu différente lorsqu'on ne pousse pas l'administration de lécithine à ce point qu'il se produit de l'hémoglobinémie et de l'hémoglobinurie, mais que l'intoxication prend un caractère plutôt chronique. Tel est le cas lorsqu'on injecte par voie intraveineuse 200 mgr. de lécithine par jour ou bien lorsqu'on introduit l'émulsion de lécithine dans l'estomac. L'image qu'on obtient alors est typée par le rapport suivant:

30 janvier 1921.

Un lapin jeune est nourri pendant deux jours exclusivement de betteraves; le nombre de globules sanguins est de 5.100.000, la teneur en hémoglobine 70 %. La préparation de sang n'offre pas d'anisocytose et tout au plus 3% de cellules polychromatophiles.

Le plasma est incolore et limpide.

L'urine ne contient pas d'urobiline.

Détermination de résistance:

Concentration de la solution	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	0 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	1	5
$\frac{1}{2}$ "	5	75
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	30	96
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	95	100
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	98	100
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	99	100

31 janvier.

Le lapin reçoit par voie intraveineuse 250 mgr. de lécithine purifiée. 20 min. après l'injection la résistance est

Concentration	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	20 %
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	5	70
$\frac{1}{2}$ "	10	95
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	30	98
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	90	99
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	95	100
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	99	100

La résistance des globules non lavés a donc diminué; celle des globules lavés est restée la même.

1^{er} février.

Concentration	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %	0 %
$(\frac{10}{9}) \times \frac{1}{2}$ "	0	10
$\frac{1}{2}$ "	15	80
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	30	95
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	90	99
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	95	100
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	95	

La résistance est revenue au niveau primitif; la fabrication de globules sanguins a légèrement augmenté.

On injecta ensuite de nouveau 250 mgr. de lécithine purifiée. $\frac{1}{2}$ heure après l'image du sang était:

Nombre des globules rouges 4.800.000; teneur en hémoglobine 70 %. La préparation montre une légère anisocytose et 10 % de cellules polychromatophiles.

Résistance :

Concentration	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^5 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 °.	0 %.
$(\frac{10}{9})^4 \times \frac{1}{2}$ "	0	25
$(\frac{10}{9})^3 \times \frac{1}{2}$ "	0	40
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ "	5	50
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	20	75
$\frac{1}{2}$ "	80	85
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	90	95
$(\frac{9}{10}) \times \frac{1}{2}$ "	95	98
$(\frac{9}{10}) \times \frac{1}{2}$ "	95	100

La résistance des globules non lavés accuse une forte diminution; la portion de régénération est nettement prononcée. L'urine ne contient pas d'urobiline.

6 heures après l'injection la résistance s'était rétablie en partie, ainsi que le prouve le petit tableau suivant :

Concentration	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^4 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %.	5 %.
$(\frac{10}{9})^3 \times \frac{1}{2}$ "	0	10
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ "	5	25
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	25	80
$\frac{1}{2}$ "	80	90

2 février.

La résistance n'avait pas encore changé. Mais l'excrétion d'urobiline était devenue fortement positive et l'est restée à partir de là pendant toute la durée de l'épreuve.

Nouvelle injection de 250 mgr. de lécithine purifiée et examen de la résistance au bout d'une heure. Résultat :

Concentration	Hémolyse	
	globules lavés	globules non lavés
$(\frac{10}{9})^4 \times \frac{1}{2}$ isotonique	0 %.	0 %.
$(\frac{10}{9})^3 \times \frac{1}{2}$ "	0	0
$(\frac{10}{9})^2 \times \frac{1}{2}$ "	0	5
$\frac{10}{9} \times \frac{1}{2}$ "	5	5
$\frac{1}{2}$ "	5	25
$\frac{9}{10} \times \frac{1}{2}$ "	25	80
$(\frac{9}{10})^2 \times \frac{1}{2}$ "	85	95
$(\frac{9}{10})^3 \times \frac{1}{2}$ "	90	98
$(\frac{9}{10})^4 \times \frac{1}{2}$ "	95	100

On ne voit donc plus cette diminution typique de la résistance qui dans d'autres circonstances s'observe comme conséquence de l'injection de lécithine.

Nous avons maintenant injecté par voie intraveineuse pendant 5 jours 250 mgr. de lécithine purifiée par jour, mais sans parvenir à modifier davantage la courbe de résistance; celle-ci restait pratiquement stationnaire et présentait donc l'allure caractéristique, bien qu'un peu exagérée, de la courbe telle que nous la connaissons dans l'anémie pernicieuse, savoir une hémolyse plus intense à côté d'une régénération plus intense (voir la fig. IX de MAY).¹⁾

L'urobilinurie devient de plus en plus forte à mesure que l'apport de phosphatide devient plus grand, au point que l'urine filtrée, qui est pour ainsi dire incolore chez le lapin normal, ou jaune clair, finit par être colorée en rouge brun foncé par l'urobiline.

Le sérum sanguin aussi, qui normalement est presque incolore, a maintenant une forte coloration jaune et il en est de même de la petite quantité de liquide que l'on peut retirer de la cavité abdominale. La diazoréaction de la bilirubine dans le sérum était fortement positive; une détermination quantitative n'a pas encore été effectuée.

La préparation de sang continua à offrir les changements caractéristiques: très forte anisocytose avec des cellules polychromatophiles beaucoup plus grandes, irrégulières (mégaloctes) et à côté de cela aussi des globules rouges très petits. Fort peu de cellules à noyau.

A la fin de l'épreuve (10 jours) le nombre de globules était de 2.950.000; la teneur en hémoglobine 52%. Si l'on compte qu'au début de l'épreuve la teneur en hémoglobine était de 70% pour un nombre de globules de 5.100.000, on voit qu'il y a une augmentation évidente de l'indice.

Le rapport reproduit ici est un exemple de beaucoup d'autres expériences, dans lesquelles l'administration de phosphatide fut réglée également de telle manière que la diminution de résistance ne fût pas trop forte. J'ai communiqué uniquement cet exemple-là, parce que j'y suis parvenu à continuer l'injection de lécithine pendant 10 jours. Dans la plupart des cas, en effet, la formation de thrombose dans les veines de l'oreille oblige à cesser les injections au bout de 5 à 7 jours. *J'ai toujours trouvé qu'après la diminution de résistance des 3 premiers jours il n'y a plus de nouvelle diminution, et dans deux cas j'ai même pu observer un retour de la résistance au niveau primitif, bien que l'urobilinurie conservât la même intensité.*

Je n'ai décrit jusqu'ici que des expériences où l'administration de phosphatide était augmentée chez des lapins qui étaient soumis autant que possible à un régime alimentaire exempt de graisse; ils étaient notamment nourris exclusivement de betteraves.

¹⁾ E. MAY, Etudes sur les résistances globulaires, Paris, Félix Alcan, 1914.

En ajoutant de l'avoine à leur nourriture, ce qui introduit, à côté de graisse et de phosphatides, une quantité considérable de cholestérine, on ne peut, même si la quantité de phosphatide fournie est aussi élevée que possible, atteindre tout au plus que l'image de l'anémie chronique due à la lécithine: faible diminution de la résistance, augmentation nette de la fraction de régénération, forte anisocytose et polychromatophilie et urobilinurie modérée.

Dans ce cas on voit la diminution de résistance disparaître régulièrement lorsqu'on continue à injecter et il peut même se produire une augmentation de résistance. L'accroissement de la fraction de globules jeunes est toujours très net.

Il en est de même pour les lapins que ont été traités à la lécithine par voie buccale. On n'obtient alors qu'un faible abaissement de la résistance, mais l'augmentation de la régénération est fortement prononcée.¹⁾

D'une façon générale il nous semble que la fraction lipoidique du sang et particulièrement la fraction des phosphatides n'est pas seulement de grande importance pour l'hémolyse intravitale, mais aussi pour la régénération. On s'en aperçoit déjà dans l'étude des tableaux de la page 54. D'ailleurs, la différence d'intensité de la régénération s'observe très nettement lorsqu'on soustre à de jeunes lapins une certaine quantité de sang et qu'on les nourrit ensuite exclusivement d'herbe et de betteraves, ou des mêmes aliments + avoine, ainsi que cela a déjà été indiqué à la page 36. C'est un fait d'observation courante dans notre laboratoire qu'un lapin ne se rétablit bien d'une hémorragie que lorsque ses aliments contiennent une quantité suffisante de lipoides. Il est évident qu'à côté de ceux-là l'avoine peut contenir d'autres substances encore, qui peuvent être également avantageuses pour la régénération de globules sanguins; nous avons nommé uniquement les phosphatides, parce que c'est au sujet du rôle favorable de ces substances que nous avons le plus de certitude, par l'analyse des courbes de résistance. Nous devons également citer à ce propos les matières lipochromes du sérum.

¹⁾ Voir R. BRINKMAN et M^{lle} E. VAN DAM, *Biochem. Zeitschr.*, **108**, loc. cit.

²⁾ Confr. HAMBURGER, *Arch. int. de Physiol.*, livre jubilaire FRÉDÉRICQ.

substances encore le phosphatide aussi peut-être transformée en un composé particulièrement actif.

Quant à ce qui regarde spécialement la grandeur des fractions de phosphatide et de cholestérine dans l'anémie clinique sérieuse, MAY ¹⁾ aussi attire l'attention sur l'importance des rapports cholestérine: phosphatide, tels que nous les avons établis dans l'anémie expérimentale mentionnée ci-dessus. GORHAM et MEYERS ²⁾ trouvèrent de faibles concentrations de cholestérine chez des malades atteints d'anémie pernicieuse et attribuèrent à ce fait une grande signification en rapport avec l'action anti-hémolytique; DENIS ³⁾ trouva la même chose. On trouve un grand nombre d'observations favorables, relatives à l'influence anti-hémolytique de la médication à la cholestérine, dans la monographie de H. ISCOVESCO ⁴⁾.

BLOOR et Mc PHERSON ⁵⁾ ont fait des recherches développées sur les concentrations des lipoides dans les anémies sérieuses; ils ont trouvé dans l'anémie pernicieuse aussi des concentrations faibles de la cholestérine; la fraction de phosphatide, déterminée chimiquement, n'était pas augmentée dans la plupart des cas. Nous ne savons pas, toutefois, si les résultats de la détermination chimique du phosphatide et ceux de l'action biologique suivent une marche parallèle; il faudrait, pour le savoir, de nouvelles recherches. GABBE ⁶⁾ et DE CRINIS ⁷⁾ ont également attribué à des changements dans les lipoides les effets de la „thérapie par excitation" (Reiztherapie) au moyen d'injections de lait, de caséosane, de collargol etc.

Dans l'anémie carcinomatique et aussi dans celles de la maladie de BRIGHT et de la syphilis on constate des changements des lipoides nets, qui sont probablement liés aux modifications observées dans le sang. Mais pour pouvoir faire des conclusions il faudrait faire des recherches plus approfondies concernant la grandeur et l'activité hémolytique des fractions lipoides.

¹⁾ MAY, loc. cit.

²⁾ Arch. int. Méd., 1917, p. 599.

³⁾ Journ. Biol. Chem., **29**, 93, 1917.

⁴⁾ H. ISCOVESCO, Les lipoides, Paris, Masson et Cie, 1908.

⁵⁾ Journ. Biol. Chem., **31**, 79, 1917.

⁶⁾ GABBE, Munch. med. Woch., **68**, 1377, 1921.

⁷⁾ DE CRINIS, *ibid.*, **68**, 473, 1921.

RÉSUMÉ.

1. La détermination de la résistance osmotique des globules sanguins se faisait, jusqu'ici, presque toujours au moyen d'une solution de $NaCl$ pure. Or, d'un point de vue de biologie générale une telle solution doit être considérée comme peu appropriée à ce genre de recherches, parce qu'elle exerce une influence déliquescente, dite lyotrope, sur les colloïdes des globules sanguins.

Pour divers degrés d'hémolyse cette influence a une intensité différente. Voilà pourquoi la courbe que l'on obtient lorsqu'on compare la concentration des solutions salines hypotoniques à l'intensité de l'hémolyse qui a lieu dans ces solutions — ce qu'on appelle la courbe de résistance — n'est pas une image fidèle de la résistance réelle des globules sanguins rouges à la différence de pression osmotique.

Cette influence lyotrope du liquide de suspension sur les globules sanguins est contrebalancée lorsque la solution contient un système physiologiquement équilibré d'ions Na^+ , Ca^{++} et H^+ , ainsi qu'on le trouve dans les nouveaux liquides de perfusion physiologiques ou dans l'ultrafiltrat du plasma.

2. Si l'on veut donc composer une solution équilibrée pour la détermination de résistance, il est nécessaire, en premier lieu, que les concentrations des ions d'hydrogène et de calcium aient une valeur physiologique et fort constante, restant la même pendant l'examen.

Ceci oblige à introduire le système tampon $H_2CO_3 + NaHCO_3$, qui, d'après les relations $H^+ = k \frac{H_2CO_3}{HCO_3^-}$ et $Ca^{++} = k_1 \frac{H^+}{HCO_3^-}$, fixe les concentrations de ces ions, pourvu que la tension de l'acide carbonique dans les solutions ne change pas. On y arrive en faisant usage de tubes à essais bien fermés et complètement remplis, et en conservant les solutions sous l'huile de paraffine dans des flacons, munis de siphons. Un contrôle des solutions reste toutefois indispensable.

J'ai exposé en détail les propriétés physico-chimiques des concentrations des ions calcium et leur importance biologique (voir p. 16).

3. Dans la détermination de résistance dans une solution saline équilibrée on constate que ce qu'on appelle l'„échelle chromatique”, l'augmentation graduelle de l'hémolyse, est un produit artificiel. On peut distinguer dans la courbe de résistance une petite fraction de globules moins résistants, „vieux”, une forte fraction (80 %) de globules

de même résistance, un peu plus élevé, et une petite fraction de globules fort résistants, „jeunes”. Par le lavage des globules dans la solution saline balancée on obtient toujours une augmentation de la résistance, dont la cause est le lessivage de lipoides à action hémolytique, que les érythrocytes enlèvent au plasma pour les adsorber à leur surface. La courbe des globules lavés rend leur résistance, telle qu'elle est sans l'influence des lipoides hémolysants du plasma. Voilà pourquoi la méthode d'examen consiste essentiellement dans la détermination de la résistance de cellules non-lavées aussi bien que lavées. Dans la courbe des cellules non lavées on reconnaît surtout les changements hémolytiques, tandis que dans la courbe des cellules lavées c'est la fraction de régénération qui est indiquée avec le plus de netteté (voir p. 37). La comparaison des deux courbes montre l'intensité des influences hémolytiques.

Les résultats que l'on peut obtenir par cette méthode ont été démontrés par des exemples, empruntés à la physiologie expérimentale et à la pathologie, de l'augmentation ou de la diminution de la destruction ou de la régénération des érythrocytes (voir p. 30—38).

Enfin, à l'exemple de HAMBURGER, j'ai fait connaître une solution de phosphates primaires et secondaires qui donne exactement la même courbe de résistance que la solution saline équilibrée (et l'ultrafiltrat lui-même), mais d'un usage beaucoup plus simple et convenant bien pour la clinique. La décroissance des concentrations salines dans ces liquides a lieu suivant une progression géométrique (voir p. 26—28).

Pour examiner de plus près l'importance des lipoides lessivables pour l'hémolyse normale ou pathologique j'ai extrait des lipoides des globules sanguins, isolés suivant le procédé de BANG, et je les ai examinés au point de vue de leur action hémolytique. J'ai constaté que la tendance des globules à l'hémolyse dépendait de la grandeur du rapport cholestérine: phosphatides, constant dans des conditions physiologiques. Je me suis occupé de l'antagonisme physico-chimique et fonctionnel entre la cholestérine et les phosphatides, toujours réunis.

Pour l'usage clinique j'ai élaboré une méthode d'extraction simple, par laquelle on peut, avec 3 cm³. de sang, étudier quantitativement l'activité hémolytique des phosphatides et l'inhibition de cette activité par la cholestérine. Quelques exemples prouvent l'utilité pratique de cette méthode (p. 45—52).

4. Je reviendrai sous peu sur la preuve que les phosphatides du

plasma, à forte activité capillaire, sont réellement concentrés à la surface des globules sanguins, dans le sens du théorème de GIBBS-THOMSON.

Enfin j'ai démontré l'importance des phosphatides pour l'étude des anémies en provoquant une anémie hémolytique expérimentale chez des lapins par rupture de l'équilibre phosphatides-cholestérine. On y arrive en administrant une grande quantité de phosphatides à l'animal recevant une nourriture exempte de cholestérine. Lorsque le lapin recevait une nourriture que n'était pas exempte de cholestérine, l'effet hémolytique des injections de phosphatide était beaucoup plus petit.

L'anémie hémolytique qui était la conséquence de ce traitement se caractérisait pas une anisocytose très prononcée, une polychromatophilie, et une augmentation nette de l'indice. Il y avait toujours une urobilinurie intense (voir p. 53—55).

Dans une intoxication par les phosphatides rapide et prolongée j'ai vu également des mégaloctes et la résistance s'abaissa au point qu'il se produisit de l'hémoglobulinurie. Lorsque l'apport de phosphatides était plus lent et plus faible, la diminution de résistance, forte au début, rétrogradait en grande partie et la courbe de résistance offrait l'image d'une destruction et d'une régénération renforcées, ainsi qu'on l'observe souvent dans les cas d'anémie pernicieuse. La grande importance des phosphatides pour la régénération des globules sanguins a aussi été démontrée nettement par ces recherches (voir p. 59).

Je crois donc être en droit de dire que des changements quantitatifs et qualitatifs des lipoides du sang jouent un grand rôle dans la genèse et la marche des anémies sérieuses et j'espère que les méthodes développées ici pourront servir, dans les études cliniques, à l'étude des changements des lipoides.
